



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
2012

**Ricardo João Borges  
Pinto**

**Compósitos de polímeros naturais e nanopartículas  
metálicas**



**Ricardo João Borges  
Pinto**

## **Compósitos de polímeros naturais e nanopartículas metálicas**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Carlos de Pascoal Neto, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Tito da Silva Trindade, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT e do FSE (SFRH/BD/45364/2008), no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio e do Programa Operacional Potencial Humano (POPH) do QREN.





## **o júri**

presidente

**Doutor António Ferreira Pereira de Melo**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Doutora Maria Helena Mendes Gil**  
Professora Catedrática da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

**Doutora Verónica Cortés de Zea Bermudez**  
Professora Catedrática da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Doutor Carlos de Pascoal Neto**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Doutor Tito da Silva Trindade**  
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

**Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Esta tese marca o culminar do meu programa de Doutoramento, e gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua conclusão bem-sucedida:

Em primeiro lugar não poderia deixar de agradecer aos meus orientadores o Doutor Carlos Pascoal Neto e o Doutor Tito Trindade não só pela orientação científica mas também pela amizade, confiança, conselhos e disponibilidade constante durante todos estes anos. O seu apoio inexcedível em todos os aspetos tem contribuído em muito para o meu “crescimento”, tanto pessoal como científico.

No entanto para o avançar deste trabalho foi necessário a ajuda de outras pessoas que contribuíram muito para a sua conclusão. Quero agradecer à Doutora Patrícia Sadocco, Sara e Jessica por toda a ajuda prestada nos “numerosos” ensaios antibacterianos realizados. Queria agradecer a simpatia e importantes conhecimentos que me transmitiram durante o período passado no INNOVHUB em Milão. Salientar a atitude de todas as pessoas do seu grupo pois fizeram-me sentir como se estivesse em casa.

À Doutora Adelaide Almeida por toda a ajuda prestada na realização dos ensaios antifúngicos nomeadamente pela disponibilização das instalações do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pela discussão dos resultados obtidos e pela disponibilidade para me esclarecer sempre que tinha alguma dúvida. Agradecer a todas as pessoas do seu laboratório, particularmente à Inês e à Carla, pela ajuda inestimável na parte prática dos ensaios.

À Doutora Carmen Freire e Doutora Susana Fernandes por toda a ajuda prestada principalmente na preparação dos filmes de quitosano e pululano. Sem dúvida a sua amizade, simpatia e conhecimentos nesta área fizeram com que esta parte do trabalho fosse sem dúvida muito agradável.

À Doutora Márcia Neves, minha subalterna especial, pela ajuda laboratorial e principalmente pela amizade e frontalidade assim como por todas as discussões científicas. Sem dúvida entre as pessoas que vou estranhar caso acabe por me mudar ela será sempre uma delas...

À Doutora Violeta Girão pela amizade e inestimável ajuda na realização das análises de TEM e de AFM. A sua ajuda e conhecimentos sem dúvida foram muito valiosos no meu trabalho ao longo destes anos.

A Doutora Rosário Soares e à Mestre Marta Ferro pela realização dos difratogramas de raios-X e pela ajuda e formação nas análises de microscopia eletrónica, respetivamente.

Queria deixar um agradecimento especial ao Doutor Armando Silvestre pois apesar de não estar ligado “diretamente” ao meu plano de Doutoramento sempre esteve disponível para ajudar em qualquer necessidade.

## **agradecimentos (cont.)**

Sem dúvida o trabalho não seria o mesmo caso não conta-se com a ajuda generosa e muito valiosa de todos os meus colegas de laboratório.

Agradeço aos meus companheiros de grupo, acima de tudo amigos, nomeadamente do NanoLab e Materiais Macromoleculares e Lignocelulósicos, e aqui não irei referir nomes pois iria-me esquecer de alguém... e acho que não são necessários nomes, eles sabem quem são.

Sem dúvida ao longo destes anos tive oportunidade de conhecer pessoas 5\*, algumas que ainda continuam por cá outras que já não, que tornam os laboratórios numa segunda casa. A amizade e espírito de entreajuda foram sem dúvida fatores essenciais para este trabalho chegar a um “bom porto”.

Ao Doutor Carlos aka Cardeal Granadeiro meu companheiro de “luta Química” (já lá vão mais de 13 anos...). A sua amizade desde a licenciatura até hoje tem-me ajudado em muitos momentos tornando, como o próprio diz, a Química um pouco mais divertida.

Aos meus grandes amigos e companheiros do Grupo “Petiscos e Mariscadas” Carlos, Domingues, Galinho, Gil, Magueta e Mohamed pela sua amizade, companheirismo e boa disposição

Às minhas “companheiras de escrita” Sónia e Carla porque realmente uma “luta” em conjunto é sempre mais fácil. A sua boa disposição e ajuda contribuíram muito para que a escrita fosse bem-disposta e seguisse sempre em frente.

Às minhas “companheiras de casa” Gisela e Joana por me ajudarem sempre que necessário mas sobretudo pela paciência a aturar-me ao longo de todos estes anos.

Ao Departamento de Química e de Biologia da Universidade de Aveiro, CICECO e INNOVHUB agradeço a disponibilidade das suas instalações para a realização deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e ao Fundo Social Europeu (FSE) pelo suporte financeiro essencial para a realização deste projeto.

Por último, mas não por isso menos importante, à minha família excecional, em especial aos meus pais pelo seu apoio incondicional, ajuda e excelente educação. Sem dúvida nós refletimos muito do que nos é transmitido pelos nossos Pais e sem dúvida os seus conselhos e sacrifícios permitiram-me ser quem sou hoje.

Por todos os momentos em Casa, no Laboratório e em outras ocasiões...muito obrigado a Todos.

## palavras-chave

Bionanocompósitos, biopolímeros, nanopartículas metálicas, atividade antimicrobiana.

## resumo

Esta tese descreve diversas estratégias de preparação assim como a caracterização de nanocompósitos com base em distintos biopolímeros. Em particular foi estudada a incorporação de nanopartículas (NPs) metálicas, nomeadamente de Ag, Cu e Au. Estes nanomateriais apresentam um potencial prático enorme em diversas áreas, no entanto foi investigada especificamente a sua aplicação como materiais antimicrobianos.

No primeiro capítulo apresenta-se uma revisão bibliográfica, onde são realçados os principais tópicos discutidos ao longo da tese. Inicialmente apresenta-se uma contextualização deste trabalho sendo seguidamente apresentadas algumas considerações sobre nanocompósitos e o seu impacto tecnológico atual. Em seguida, descrevem-se as vantagens do uso de NPs como cargas nos materiais compósitos especificamente no caso de bionanocompósitos. Foi focado o uso da celulose como matriz uma vez que foi o composto “base” usado neste trabalho. Fez-se a descrição exaustiva das metodologias existentes na literatura para a preparação dos nanocompósitos celulósicos com diferentes NPs metálicas assim como das respetivas aplicações. Dentro das aplicações, foi dado especial destaque às propriedades antimicrobianas dos materiais preparados seja a nível da sua atividade antibacteriana ou antifúngica. Esta introdução privilegia o trabalho relacionado diretamente com os sistemas descritos nos capítulos subsequentes.

No segundo capítulo apresentam-se os resultados obtidos para nanocompósitos de prata em matriz celulósica. Através do uso de metodologias, tais como a síntese *in situ* e a pós-deposição, foram preparados diversos materiais usando dois substratos celulósicos distintos nomeadamente a celulose vegetal e bacteriana. Estes nanocompósitos foram caracterizados em termos da sua morfologia e composição química, verificando-se a importância destas características na sua atividade antibacteriana. Foi verificado que nanocompósitos com teores de Ag de  $5 \times 10^{-4}$  (% m/m) são suficientes para obter atividade antibacteriana. A libertação de Ag(I) foi estudada em alguns destes materiais de modo a tentar perceber o mecanismo subjacente a este tipo de nanocompósitos.

No terceiro capítulo é apresentado o estudo de NPs coloidais de Ag e Au como cargas para a preparação de nanocompósitos à base de quitosano não-modificado e modificado quimicamente (derivado solúvel em água e derivado anfifílico). Foram preparados filmes finos de espessura de 9-14  $\mu\text{m}$ , caracterizando-se as suas propriedades óticas e antibacterianas. As propriedades óticas foram ajustadas, quer pela variação do teor de NPs de Ag (0,3-3,9% m/m) ou pela utilização de amostras de NPs com distribuição de tamanho de partícula distinta. Foi investigada a atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*) como para Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*).

## resumo (cont.)

Para nanocompósitos preparados com o quitosano não modificado verificou-se uma dependência em função do teor de Ag. No caso do uso de derivados modificados, os materiais preparados mostraram uma eficiência superior, mesmo sem NPs de Ag.

No quarto capítulo é apresentada a síntese e caracterização de nanocompósitos de pululano e NPs de Ag. Neste estudo é avaliada a atividade antifúngica dos filmes compósitos preparados contra o *Aspergillus niger* usando protocolos padrão. Estes materiais foram preparados na forma de filmes (66-74  $\mu\text{m}$  de espessura) por evaporação de solvente da mistura de pululano e coloides de Ag. Foi observado o aumento da inibição do fungo na presença dos nanocompósitos, tendo sido pela primeira vez mostrado o efeito disruptivo destes materiais sobre os esporos do *A. niger* através da análise das imagens de SEM. Este efeito ocorre na presença dos filmes devido à presença das cargas de NPs de Ag dispersas no pululano.

O desenvolvimento de materiais de papel com NPs de Cu é um desafio devido à propensão destas espécies em oxidar sob condições ambiente. No quinto capítulo é descrita pela primeira vez o estudo comparativo do crescimento e estabilidade de NPs de Cu em celulose vegetal e bacteriana. Para além disso foi avaliado o uso de nanoestruturas com diferentes dimensionalidades como cargas, nomeadamente nanoesferas e nanofios. Foi observado que o uso de nanofios aumenta a resistência à oxidação destes nanocompósitos para tempos de exposição ao ar mais prolongados. As matrizes celulósicas apresentam comportamento distinto no crescimento e/ou adsorção das NPs de Cu. A celulose bacteriana foi o substrato mais eficiente para retardar a oxidação das NPs. A atividade antibacteriana destes nanocompósitos foi avaliada.

Ao longo desta dissertação são apresentados métodos distintos para a obtenção de nanocompósitos com base em biopolímeros e NPs metálicas. Estes estudos permitiram não só a preparação de novos nanocompósitos mas também compreender e otimizar os mecanismos subjacentes à sua preparação. Ao mesmo tempo, este trabalho contribuiu para a transferência de tecnologia e conhecimento entre a área da Nanotecnologia e a área dos materiais derivados de fontes renováveis. As propriedades apresentadas por estes nanomateriais mostraram a sua possível aplicação como novos materiais antimicrobianos, no entanto é possível antecipar futuras aplicações em outras áreas tecnológicas.

## keywords

Bionanocomposites, biopolymers, metallic nanoparticles, antimicrobial activity.

## abstract

This thesis describes different preparative strategies for preparation and characterisation of biobased nanocomposites. It was studied the incorporation de metallic nanoparticles (NPs), namely Ag, Cu and Au. These nanomaterials present an enormous practical potential in diverse fields, however it was specifically been investigated their application like antimicrobial materials.

In the first chapter a literature review is presented, where are highlighted the main topics discussed throughout the thesis. Initially the fundamentals aspects concerning this study are briefly presented and then some consideration about the nanocomposites and its current technological impact. Then it was described the advantages of using NPs as fillers in composite materials specifically in case of bionanocomposites. It has been focused on the use of cellulose as matrix since it was the main compound used in this work. There was made a detailed description of the methodologies reported in literature for the preparation of cellulosic based metallic NPs nanocomposites as well as the corresponding applications. Within the applications, it was give special emphasis to the antimicrobial properties, antibacterial or antifungal, of the prepared materials. This introduction highlights the work directly related with the systems described in the subsequent chapters.

In the second chapter the results obtained for cellulose/silver nanocomposites are presented. Various materials were prepared using two different cellulose substrates including vegetable and bacterial cellulose through the use of methods such *in situ* synthesis and electrostatic assembly. These nanocomposites were characterized in terms of their morphology and chemical composition, verifying the importance of these characteristics on their antibacterial activity. It was found that nanocomposites with silver content of  $5 \times 10^{-4}$  (% w/w) make them effective antibacterial materials. The silver ion release was studied to a better understanding of the antibacterial mechanism underlying to this type of nanocomposites.

In the third chapter the study of colloidal Ag and Au NPs as fillers for the preparation of nanocomposites based on unmodified and chemically modified chitosan (water-soluble and amphiphilic derivatives) is presented. The nanocomposites were used to prepare cast thin films (9-14  $\mu\text{m}$  thickness) that are characterized for their optical and antibacterial properties. The optical properties were adjusted either by varying the Ag NPs content in the films (0.3-3.9% w/w) or by using samples of Ag NPs with distinct particle size distribution. The antibacterial activity towards both Gram-negative (*K. pneumoniae* and *E. coli*) and Gram-positive bacteria (*S. aureus*) was investigated for the various composites. For the unmodified chitosan nanocomposites, the bactericidal effect depended on their Ag content. For the modified ones, the materials prepared showed a superior efficiency, even without Ag NPs.

**abstract  
(cont.)**

In the fourth chapter the synthesis and characterization of pullulan/Ag nanocomposites is presented. In this study the antifungal activity of composite films of pullulan and Ag NPs against *A. niger* was evaluated using standard protocols. These materials were prepared as transparent cast films (66-74  $\mu\text{m}$  thickness) from Ag hydrosols containing the polysaccharide. Fungal growth inhibition was observed in the presence of the silver nanocomposite films. Moreover, disruption of the spores cells of *A. niger* was probed for the first time by means of scanning electron microscopy. This effect occurs in the presence of the nanocomposites due to Ag NP dispersed as fillers in pullulan.

The design of paper products based on copper NPs is a challenge because of the intrinsic propensity of Cu to oxidize in contact with air. In the fifth chapter a comparative study on the growth and chemical stability of Cu NPs in vegetable and bacterial cellulose is described for the first time. Cu nanospheres and Cu nanowires (NWs), in both types of cellulose. Cu NWs were found to be more resistant to oxidation caused by prolonged air exposure than the Cu nanospheres. The cellulosic matrices behave differently for the growth or adsorption of the Cu nanofillers. Bacterial cellulose fibers were the most efficient substrate to delay surface oxidation. The antibacterial activity of these nanocomposites was evaluated.

In this thesis different methods for obtaining nanocomposites based on biopolymers and metallic NPs are presented. These studies not only allowed the preparation of new nanocomposites but also understand and optimize the mechanisms underlying their preparation. This work has contributed to the transfer of technology and knowledge between the areas of Nanotechnology and materials derived from renewable sources. The properties provided by these nanomaterials have shown their potential application as new antimicrobial materials; however it is possible to anticipate future applications in other technological areas.

# Índice

Índice .....	i
Lista de abreviaturas/acrónimos e símbolos .....	vii
Índice de figuras.....	xi
Índice de Tabelas .....	xvii
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento deste trabalho.....	4
1.2 Nanocompósitos.....	6
1.2.1 Classificação de nanocompósitos .....	7
1.2.2 Nanocompósitos poliméricos com NPs.....	9
1.2.3 Bionanocompósitos .....	11
1.3 Nanopartículas como cargas inorgânicas em bionanocompósitos .....	13
1.3.1 Nanopartículas metálicas.....	14
1.4 Bionanocompósitos celulose/NPs metálicas.....	16
1.4.1 Estratégias de preparação .....	16
1.4.1.1 Mistura dos componentes .....	16
1.4.1.2 Redução in situ dos sais metálicos.....	17
Adição de agentes redutores externos .....	18
Redução dos sais metálicos pelos grupos redutores da celulose .....	19
Crescimento foto-induzido das NPs usando irradiação .....	20

1.4.1.3 Pós-deposição das NPs previamente sintetizadas .....	20
1.4.1.4 Outras metodologias .....	21
1.4.2 NPs metálicas como cargas em nanocompósitos celulósicos e respectivas aplicações ....	22
1.4.2.1 Prata .....	22
1.4.2.2 Ouro .....	24
1.4.2.3 Cobre .....	25
1.4.2.4 Platina .....	27
1.4.2.5 Cobalto .....	28
1.4.2.6 Ligas metálicas .....	28
1.5 Atividade antimicrobiana de NPs metálicas .....	29
1.5.1 Atividade antibacteriana .....	32
1.5.2 Atividade antifúngica .....	34
1.6 Objetivos do trabalho .....	37
1.7 Referências .....	39
 <b>CAPÍTULO 2 – NANOCOMPÓSITOS DE PRATA DE MATRIZ CELULÓSICA (CB E CV).....</b>	<b>53</b>
2.1 Introdução.....	55
2.2 Preparação e caracterização de nanocompósitos celulose/Ag .....	57
2.2.1 Preparação de nanocompósitos através da metodologia <i>in situ</i> .....	58
2.2.2 Preparação de nanocompósitos através da metodologia LbL e difusão .....	65
2.3 Estudos da atividade antibacteriana dos nanocompósitos .....	68
2.4 Estudos de libertação catiónica de Ag pelos nanocompósitos .....	73



2.3. Conclusões .....	77
2.4. Referências .....	78
 <b>CAPÍTULO 3 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FILMES COMPÓSITOS À BASE DE QUITOSANO OU DERIVADOS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OURO.....</b>	<b>81</b>
3.1 Introdução.....	83
3.2 Preparação e caracterização de nanocompósitos quitosano/Ag .....	87
3.3 Estudo da atividade antibacteriana dos nanocompósitos quitosano/Ag .....	94
3.4. Nanocompósitos quitosano/Au .....	100
3.5. Conclusões .....	104
3.6. Referências .....	105
 <b>CAPÍTULO 4 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FILMES DE NANOCOMPÓSITOS DE PULULANO E PRATA COLOIDAL.....</b>	<b>111</b>
4.1 Introdução.....	113
4.2 Síntese e caracterização de nanocompósitos pululano/Ag .....	116
4.3 Atividade antifúngica dos filmes de pululano/Ag.....	120
4.4 Avaliação da atividade antifúngica dos nanocompósitos como material de embalagem de frutos .....	126
4.5 Conclusões.....	129
4.6 Referências .....	130

**CAPÍTULO 5 – PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE QUÍMICA DE NANOESTRUTURAS DE COBRE EM FIBRAS CELULÓSICAS.....135**

5.1 Introdução.....	137
5.2 Preparação e caracterização de nanoestruturas de cobre e de nanocompósitos celulose/Cu ....	140
5.2.1 Preparação e caracterização de NPs de Cu e de nanocompósitos celulose/NPs Cu.....	140
5.2.2 Preparação e caracterização de NFs de Cu e de nanocompósitos celulose/NFs Cu.....	147
5.3. Estudos de atividade antibacteriana em nanocompósitos celulose/Cu .....	152
5.4. Conclusões.....	155
5.5. Referências .....	156

**CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....161**

**CAPÍTULO 7 – PARTE EXPERIMENTAL.....165**

7.1 Materiais e reagentes.....	168
7.1.1 Biopolímeros .....	168
7.1.2 Reagentes .....	169
7.2 Procedimentos experimentais das sínteses químicas.....	170
7.2.1 Síntese das NPs de Ag .....	170
7.2.1.1 Redução do $Ag^+$ com borohidreto de sódio.....	170
7.2.1.2 Redução do $Ag^+$ com citrato de sódio.....	170
7.2.2 Preparação <i>in situ</i> dos nanocompósitos celulose/Ag .....	170
7.2.2.1 Redução do $Ag^+$ com borohidreto de sódio.....	170

---

7.2.2.2 Redução do $\text{Ag}^+$ sob radiação UV .....	171
7.2.3 Pós-deposição de NPs de Ag .....	171
7.2.3.1 Preparação através da metodologia LbL .....	171
7.2.3.2 Difusão das NPs de Ag para as membranas de BC .....	172
7.2.4 Estudo da libertação de Ag(I) pelos nanocompósitos celulose/Ag .....	172
7.2.5 Preparação de filmes compósitos quitosano/NPs metálicas .....	172
7.2.5.1 Filmes quitosano/Ag .....	172
7.2.5.2 Filmes quitosano/Au .....	172
7.2.6 Preparação de filmes compósitos pululano/Ag .....	173
7.2.7 Preparação de nanoestruturas de Cu e dos nanocompósitos celulose/Cu .....	173
7.2.7.1 Preparação das NPs de Cu .....	173
7.2.7.2 Preparação dos NFs de Cu .....	173
7.2.7.3 Preparação dos nanocompósitos celulose/Cu .....	174
7.3 Culturas e meios de cultura para os ensaios antibacterianos .....	174
7.4 Ensaios antimicrobianos de nanocompósitos .....	175
7.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana dos nanocompósitos celulose/Ag, quitosano/Ag e celulose/Cu .....	175
7.4.2 Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana dos nanocompósitos CH/Ag (teste de halo) .....	176
7.4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos nanocompósitos pululano/Ag .....	177
7.4.4 Estudo da atividade antifúngica dos nanocompósitos PL/Ag como material de embalagem de frutos .....	177

7.5 Técnicas e métodos de caracterização instrumental.....	178
7.5.1 Difração de raios X de pós (XRD).....	178
7.5.2 Dispersão dinâmica de luz (DLS).....	178
7.5.3 Espetrometria de emissão atômica por ICP.....	178
7.5.4 Espetrometria de RMN $^1\text{H}$ .....	178
7.5.5 Espectroscopia de UV-Vis .....	179
7.5.6 Espectroscopia vibracional .....	179
7.5.7 Medição da espessura dos filmes.....	179
7.5.8 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e de varrimento em transmissão (STEM) de alta resolução .....	179
7.5.9 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	180
7.5.10 Microscopia de força atômica (AFM).....	180
7.6 Referências .....	181

## Lista de abreviaturas/acrônimos e símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i> )
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CB	Celulose bacteriana
CFU	Unidades formadoras de colônias (do inglês <i>Colony Forming Units</i> )
CH	Quitosano
CN	Caldo nutritivo
CNTs	Nanotubos de carbono (do inglês <i>Carbon Nanotubes</i> )
CV	Celulose vegetal
DCH	<i>N</i> -dodecil quitosano
DLS	Dispersão dinâmica de luz (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i> )
DSMZ	Coleção Alemã de Micro-organismos e culturas celulares (do alemão <i>Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH</i> )
EDX	Espectroscopia de dispersão de energia de raios X (do inglês <i>Energy Dispersive X-Ray spectroscopy</i> )
En	Etilenodiamina
EPTAC	Cloreto de (2,3-epoxipropil)trimetilamônio (do inglês <i>(2,3-epoxypropyl)trimethylammonium chloride</i> )
FGI	Percentagem de inibição do crescimento fúngico (do inglês <i>Fungal Growth Inhibition</i> )
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
GD	Grau de desacetilação

GTMAC	Cloreto de glicidiltrimetilamônio (do inglês <i>glycidyltrimethylammonium chloride</i> )
HTCCH	Cloreto de <i>N</i> -[(2-hidroxi-3-trimetilamônio)propil]quitosano
ICP	Espectrometria de plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma</i> )
IV	Infravermelho
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
LbL	Camada a camada (do inglês <i>Layer-by-Layer</i> )
MOFs	Redes Cristalinas Metalo-Orgânicas (do inglês <i>Metal-Organic Frameworks</i> )
NFs	Nanofios
NPs	Nanopartículas
PBS	Poli(succinato de butileno) (do inglês <i>poly(butylene succinate)</i> )
PCL	Policaprolactona (do inglês <i>poly(<math>\epsilon</math>-caprolactone)</i> )
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PDDA	Poli(cloreto de dialildimetilamônio)
PEI	Polietilenoimina
PES	Poli(succinato de etileno) (do inglês <i>poly(ethylene succinate)</i> )
PHB	Poli- $\beta$ -hidroxibutirato (do inglês <i>poly(<math>\beta</math>-hydroxybutyrate)</i> )
PHBV	Poli- $\beta$ -hidroxibutirato-co- $\beta$ -hidroxivalerato ( <i>poly(<math>\beta</math>-hydroxybutyrate-co-<math>\beta</math>-hydroxyvalerate)</i> )
PL	Pululano
PLA	Ácido polilático (do inglês <i>poly(L-lactide)</i> )
PPDO	Poli( <i>p</i> -dioxanona) (do inglês <i>poly(p-dioxanone)</i> )
PSS	Poli(4-estireno sulfonato de sódio)
PVP	Polivinilpirrolidona
RMN $^1\text{H}$	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SLM	Suspensão líquida microbiana
STEM	Microscopia eletrónica de varrimento com deteção de transmissão (do inglês <i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i> )
SERS	Difusão de Raman intensificada por superfície (do inglês <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> )
SPR	Ressonância de plasmão de superfície (do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i> )
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (do inglês <i>2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl</i> )
TSA	<i>Tryptone Soya Agar</i>
u.a.	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
XRD	Difração de raios X (do inglês <i>X-ray Diffraction</i> )
$\lambda$	Comprimento de onda
$\zeta$	Potencial Zeta
$\theta$	Ângulo de difração de raios X





## Índice de figuras

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1</b> – Representação esquemática das duas classes de materiais híbridos [36].....	<b>7</b>
<b>Figura 1.2</b> – Representação esquemática das principais vias químicas usadas na preparação de materiais híbridos orgânico-inorgânico [2].....	<b>9</b>
<b>Figura 1.3</b> – Exemplos de aplicação prática de nanocompósitos de base polimérica (adaptado de [2]). .....	<b>10</b>
<b>Figura 1.4</b> – Número de publicações por ano dos trabalhos sobre: a) nanocompósitos poliméricos e b) nanocompósitos à base de biopolímeros. Dados recolhidos a partir de ISI Web of Knowledge <sup>SM</sup> [45]. .....	<b>11</b>
<b>Figura 1.5</b> – Diferentes morfologias de NPs nomeadamente nanobastonetes de Au (a), nanoprismas de Ag (b) e nanofios de Ag (c). Variação da cor da solução coloidal de NPs de Au e Ag em função do tamanho e da morfologia (d); da direita para a esquerda – nanoesferas de Ag (80 nm), nanoesferas de Ag (20 nm), nanoesferas de Au (40 nm), nanoesferas de Au (12 nm), nanodiscos de Ag (200 nm), nanodiscos de Ag (120 nm) e nanodiscos de Ag (60 nm) [63-66]. .....	<b>15</b>
<b>Figura 1.6</b> – Esquema da formação de nanocompósitos CB/Au usando o PEI (adaptado de [104]). .....	<b>19</b>
<b>Figura 1.7</b> – Imagens de SEM e fotografias digitais da CB (a) e respetivos nanocompósitos: CB/Ag (b), CB/Au (c) e CB/Cu (d) (barra de escala: 1,5 $\mu$ m) [140]. .....	<b>26</b>
<b>Figura 1.8</b> – Esquema resumido das possíveis interações das NPs de Ag com células bacterianas. As NPs de Ag podem: (1) libertar iões Ag(I) e originar ROS, (2) interagir com as proteínas da membrana afetando as suas funções, (3) acumular-se na membrana celular afetando a sua permeabilidade e (4) entrar na célula onde pode originar ROS, libertar iões Ag(I) e afetar o ADN. As espécies ROS e iões Ag(I) podem também afetar o ADN, a membrana celular e as proteínas da membrana (adaptada de [152]). .....	<b>31</b>
<b>Figura 1.9</b> – Representação esquemática da estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas assim como as morfologias que podem apresentar (adaptada de [161]). .....	<b>32</b>
<b>Figura 1.10</b> – Imagem de microscopia de um micélio com hifas septadas (a) [167] e esquema de conídios de <i>Aspergillus</i> agrupados (b) [169]. .....	<b>35</b>

### Capítulo 2

<b>Figura 2.1</b> – Espectro de UV-vis e correspondente fotografia digital (a) e imagem de TEM (b) de coloides de Ag obtidos por redução com borohidreto de sódio. ....	<b>57</b>
<b>Figura 2.2</b> – Fotografias digitais dos nanocompósitos de CV/Ag (a) e CB/Ag (b). ....	<b>59</b>
<b>Figura 2.3</b> – Espectros óticos de nanocompósitos de celulose/Ag obtidos por redução de Ag(I) com borohidreto (a) e sob radiação UV (b). .....	<b>60</b>
<b>Figura 2.4</b> – Imagens de SEM do nanocompósito CV/Ag <sub>borl</sub> (a e b) e do nanocompósitos CB/Ag <sub>borl</sub> (c e d) a diferentes ampliações. ....	<b>60</b>

<b>Figura 2.5</b> – Imagem de SEM do nanocompósito CV/Ag <sub>bor1</sub> (a) e respetivo espetro de EDX (b)...	<b>61</b>
<b>Figura 2.6</b> – Imagem de SEM do nanocompósito CV/Ag <sub>bor1</sub> (a) e correspondente mapa de distribuição de elementos de Ag:C (b) (ampliação 35 kx).	<b>62</b>
<b>Figura 2.7</b> – Imagem de SEM do nanocompósito CB/Ag <sub>bor1</sub> (a) e correspondente mapa de distribuição de elementos de Ag:C (b), Ag (c) e C (d) (ampliação 18 kx).	<b>62</b>
<b>Figura 2.8</b> – Imagens de SEM do nanocompósito CV/Ag <sub>UV1</sub> (inserção: espetro caraterístico de EDX mostrando a presença de Ag) (a) e nanocompósito de CB/Ag <sub>UV1</sub> mostrando as diferentes morfologias (b).	<b>63</b>
<b>Figura 2.9</b> – Difrátogramas de raios X dos nanocompósitos CV/Ag <sub>bor1</sub> (a) e CB/Ag <sub>UV1</sub> (b).	<b>64</b>
<b>Figura 2.10</b> – Potencial Zeta de fibras de celulose em função do pH e da metodologia de extração [34].	<b>65</b>
<b>Figura 2.11</b> – Estrutura química dos dois polielectrólitos utilizados: PDDA – poli(cloreto de dialildimetilamónio) e PSS – poli(4-estirenosulfonato de sódio)	<b>66</b>
<b>Figura 2.12</b> – Imagem de SEM do nanocompósito CV//Ag <sub>1</sub> preparado por LbL a diferentes ampliações: 6 kx (a) e 50 kx (b).	<b>66</b>
<b>Figura 2.13</b> – Fotografias digitais da membrana húmida da CB inicial (a) e do nanocompósito CB/Ag <sub>dir2</sub> obtido após imersão da CB nos coloides de Ag (b).	<b>67</b>
<b>Figura 2.14</b> – Atividade antibacteriana das amostras de referência e dos nanocompósitos contra <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> . Os testes foram realizados em 300 mg para amostras com CV e 50 mg para as amostras à base de CB.	<b>69</b>
<b>Figura 2.15</b> – Atividade antibacteriana das amostras de referência e dos nanocompósitos celulose/Ag contra <i>B. subtilis</i> (teste a). Na figura foram incluídos os teores finais em Ag dos nanocompósitos (% m/m).	<b>70</b>
<b>Figura 2.16</b> – Atividade antibacteriana das amostras de referência e dos nanocompósitos celulose/Ag contra <i>S. aureus</i> (teste b). Na figura foram incluídos os teores finais em Ag dos nanocompósitos (% m/m).	<b>71</b>
<b>Figura 2.17</b> – Atividade antibacteriana da referência de CV e dos nanocompósitos CV/Ag contra <i>K. pneumoniae</i> (teste b). Na figura foram incluídos os teores finais em Ag dos nanocompósitos (% m/m).	<b>72</b>
<b>Figura 2.18</b> – Exemplos do comportamento de libertação de Ag(I) para fibras de poli(acrilonitrilo)/Ag (concentração de AgNO <sub>3</sub> : a) 0,5% e b) 1,25%) [39] e fibras de gelatina/Ag [40].	<b>73</b>
<b>Figura 2.19</b> – Fração de Ag <sup>+</sup> libertada em função do tempo para: nanocompósitos CV/Ag obtidos através da metodologia de redução com borohidreto (Ag <sub>bor4</sub> ) e LbL (Ag <sub>7</sub> ) (a) e nanocompósitos CB/Ag obtidos através da redução com borohidreto (Ag <sub>bor3</sub> ), difusão (Ag <sub>dir2</sub> ) e redução sob radiação UV (Ag <sub>UV4</sub> ) (b).	<b>75</b>

### Capítulo 3

<b>Figura 3.1</b> – Estrutura química da unidade básica do quitosano.	<b>84</b>
<b>Figura 3.2</b> – Estruturas químicas da unidade básica dos derivados modificados do quitosano.	<b>87</b>
<b>Figura 3.3</b> – Imagens de TEM dos nanocompósitos quitosano/Ag: CH/AgC (a) e CH/AgB (b).	<b>89</b>
<b>Figura 3.4</b> – Difrátograma de raios X do nanocompósito CH/AgC10.	<b>90</b>

<b>Figura 3.5</b> – Espectros de FTIR do CH e nanocompósitos CH/Ag (a), HTCCH e respetivo nanocompósito com Ag (b) e DCH e respetivo nanocompósito com Ag (c).....	<b>90</b>
<b>Figura 3.6</b> – Fotografias digitais dos nanocompósitos CH/Ag (redução da prata pelo método do borohidreto): CH/AgB (a), CH/AgB2 (b), CH/AgB5 (c), CH/AgB10 (d) e respetivos espectros óticos (e). ....	<b>91</b>
<b>Figura 3.7</b> – Fotografias digitais dos nanocompósitos CH/Ag (redução da prata pelo método do citrato): CH/AgC (a), CH/AgC2 (b), CH/AgC5 (c), CH/AgC10 (d) e respetivos espectros óticos (e). ....	<b>91</b>
<b>Figura 3.8</b> – Imagens de SEM dos filmes: CH/AgC2 (a), CH/AgC5 (b) e CH/AgC10 (c).....	<b>92</b>
<b>Figura 3.9</b> – Imagens de STEM dos filmes nanocompósitos CH/Ag (redução da prata pelo método do citrato) com teores crescentes de Ag (% m/m): 0,470 (a), 1,10 (b), 2,58 (c) e 3,94 (d). ....	<b>93</b>
<b>Figura 3.10</b> – Imagem 3D de AFM do nanocompósito preparado com o derivado de quitosano solúvel em água (HTCCH/AgC).....	<b>94</b>
<b>Figura 3.11</b> – Atividade antibacteriana do filme de CH e dos nanocompósitos CH/Ag (redução de Ag(I) pelo método do citrato) contra diferentes bactérias: <i>S. aureus</i> (a), <i>K. pneumoniae</i> (b) e <i>E. coli</i> (c). As linhas horizontais pretas indicam a concentração (CFU.mL <sup>-1</sup> ) a t <sub>0</sub> . ....	<b>96</b>
<b>Figura 3.12</b> – Atividade antibacteriana do filme CH/AgB contra <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> . A linha horizontal preta indica a concentração (CFU.mL <sup>-1</sup> ) a t <sub>0</sub> . ....	<b>97</b>
<b>Figura 3.13</b> – Fotografias digitais dos halos de inibição nas placas de agar inoculadas com <i>S. aureus</i> após incubação: ausência de nanocompósito (a), presença do nanocompósito CH/AgC (b; a amostra foi retirada) e presença do nanocompósito CH/AgC5 (c; amostra não retirada). ....	<b>98</b>
<b>Figura 3.14</b> – Atividade antibacteriana dos nanocompósitos de CH modificado/Ag contra <i>S. aureus</i> (a) e <i>K. pneumoniae</i> (b). A linha horizontal preta indica a concentração (CFU.mL <sup>-1</sup> ) a t <sub>0</sub> . ....	<b>99</b>
<b>Figura 3.15</b> – Espectro ótico do coloide de Au e correspondente fotografia digital (a) e distribuição de tamanhos das NPs de Au, em água, obtida por DLS (b). ....	<b>100</b>
<b>Figura 3.16</b> – Fotografia digital do filme CH/Au (a) e respetivo espectro ótico (b). ....	<b>101</b>
<b>Figura 3.17</b> – Atividade antibacteriana das amostras de controlo, quitosano (CH) e pululano (PL) e dos nanocompósitos com NPs de Au contra <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> . ....	<b>102</b>

## Capítulo 4

<b>Figura 4.1</b> – Estrutura química da unidade básica do pululano. ....	<b>114</b>
<b>Figura 4.2</b> – Placa de Petri inoculada com o <i>A. niger</i> e correspondente imagem de SEM mostrando as hifas, os conidióforos e os esporos. ....	<b>115</b>
<b>Figura 4.3</b> – Imagem de TEM das NPs de Ag sintetizadas e histograma com a respetiva distribuição de tamanhos: redução pelo borohidreto (a) e pelo citrato (b). ....	<b>117</b>
<b>Figura 4.4</b> – Fotografias digitais dos nanocompósitos de pululano com Ag: PL/AgB2 (a), PL/AgB5 (b), PL/AgB10 (c), PL/AgC1 (d), PL/AgC5 (e) e PL/AgC10 (f). ....	<b>118</b>
<b>Figura 4.5</b> – Espectros óticos da matriz de PL e dos nanocompósitos PL/AgB (a) e PL/AgC (b). ..	<b>118</b>
<b>Figura 4.6</b> – Imagens de SEM do filme PL/AgC5. ....	<b>119</b>
<b>Figura 4.7</b> – Espectros de FTIR da matriz de PL e dos nanocompósitos PL/AgB (a) e PL/AgC (b). ....	<b>119</b>

<b>Figura 4.8</b> – Difractogramas de raios X da matriz de PL e do nanocompósito PL/AgB5. ....	<b>120</b>
<b>Figura 4.9</b> – Efeito do filme de PL e dos nanocompósitos PL/AgB, PL/Ag <sup>+</sup> (a) e PL/AgC (b) no crescimento do <i>A. niger</i> (3 ensaios independentes). ....	<b>121</b>
<b>Figura 4.10</b> – Fotografias digitais das placas de agar contendo o nanocompósito PL/AgB10 na forma de disco inoculadas com <i>A. niger</i> , após 4 dias em contacto: 1 disco (a) e 2 discos (b) .....	<b>122</b>
<b>Figura 4.11</b> – Imagens de SEM dos conídios (painel da esquerda) e hifas (painel da direita) do <i>A. niger</i> após exposição ao filme PL/AgB <sub>10</sub> (painel inferior) em relação à amostra de controlo PL (painel superior).....	<b>123</b>
<b>Figura 4.12</b> – Imagens de SEM dos esporos do <i>A. niger</i> : amostra de controlo (a) e após contacto com o nanocompósito PL/AgB <sub>10</sub> (b). ....	<b>124</b>
<b>Figura 4.13</b> – Imagens de SEM dos esporos do <i>A. niger</i> expostos aos nanocompósitos PL/AgB10 (a) e PL/AgC10 (b). ....	<b>125</b>
<b>Figura 4.14</b> – Fotografias digitais dos morangos no recipiente revestido com filme de PL; t = 0 dias (a) e dos morangos no recipiente revestido com o filme compósito, t = 2 dias (b). ....	<b>126</b>
<b>Figura 4.15</b> – Fotografias digitais dos morangos durante o ensaio.....	<b>127</b>
<b>Figura 4.16</b> – Número de dias decorridos até aparecimento de fungos nos morangos embalados com filme de PL e com o filme compósito PL/AgB2. As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão (n =3).....	<b>128</b>
 <b>Capítulo 5</b>	
<b>Figura 5.1</b> – Espectro ótico, correspondente fotografia digital (a) e análise de DLS da distribuição de tamanhos (b) do coloide de Cu.....	<b>140</b>
<b>Figura 5.2</b> – Espectro ótico do coloide de Cu após 24 horas de exposição ao ar. ....	<b>141</b>
<b>Figura 5.3</b> – Espectros óticos (função Kubelka/Munk) dos nanocompósitos CB/NPs Cu com as correspondentes fotografias digitais; concentração inicial de sal de cobre (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O): 0,01 (a) e 0,1 M (b). ....	<b>142</b>
<b>Figura 5.4</b> – Imagens de SEM dos nanocompósitos CB/NPs Cu. ....	<b>143</b>
<b>Figura 5.5</b> – Espectros de FTIR da CB pura (a) e do nanocompósito CB/NPs Cu: após a preparação (b) e após 6 semanas de exposição ao ar (c). ....	<b>143</b>
<b>Figura 5.6</b> – Difractogramas de raios X do nanocompósito CB/NPs Cu para tempos distintos de exposição ao ar. Fases: BC (*), Cu (▼), CuCO <sub>3</sub> (○) e Cu(OH) <sub>2</sub> (□). ....	<b>144</b>
<b>Figura 5.7</b> – Espectros óticos (função Kubelka/Munk) dos compósitos CB/NPs Cu para tempos distintos de exposição ao ar com as fotografias digitais respetivas: nanocompósito inicial (a), 2 semanas (b), 4 semanas (c), 6 semanas (d) e 8 semanas (e). ....	<b>145</b>
<b>Figura 5.8</b> – Imagens de SEM do nanocompósito CV/NPs Cu, espectro ótico com a fotografia digital respetiva e espectro de EDX confirmando a presença de cobre. ....	<b>146</b>
<b>Figura 5.9</b> – Imagens de SEM dos compósitos CB/NPs Cu após seis semanas de exposição ao ar. ....	<b>147</b>
<b>Figura 5.10</b> – Fotografia digital dos NFs de Cu após a síntese (a), imagem de SEM (b), difratograma de raios X (c) e respetivo espectro de EDX (d) dos NFs de Cu.....	<b>148</b>
<b>Figura 5.11</b> – Imagens de SEM do compósito CB/NFs Cu.....	<b>149</b>

---

<b>Figura 5.12</b> – Fotografias digitais da suspensão aquosa dos NFs de Cu e do respetivo compósito com CB para tempos distintos de exposição ao ar. ....	<b>150</b>
<b>Figura 5.13</b> – Espectros óticos (função Kubelka/Munk) dos compósitos CB/NFs Cu para tempos distintos de exposição ao ar. ....	<b>150</b>
<b>Figura 5.14</b> – Imagens de SEM e TEM dos NFs de Cu secos e após 3 dias de exposição ao ar (a, b e c) e do compósito CB/NFs Cu após 5 meses de exposição ao ar (d). ....	<b>151</b>
<b>Figura 5.15</b> – Difractograma de raios X dos NFs de Cu após 3 dias de exposição ao ar (a) e do nanocompósito CB/NFs Cu para tempos distintos de exposição ao ar. ....	<b>152</b>
<b>Figura 5.16</b> – Atividade antibacteriana das amostras de controlo e dos nanocompósitos com Cu (nanoesferas ou NFs) contra <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> . ....	<b>153</b>
<b>Figura 5.17</b> – Fotografias digitais de placas de agar inoculadas com <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> após 24 h. ....	<b>153</b>



## Índice de Tabelas

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.1</b> – Vantagens e desvantagens da preparação de nanocompósitos com base em biopolímeros e NPs inorgânicas.....	<b>13</b>
<b>Tabela 1.2</b> – Metodologias de preparação de nanocompósitos celulose/NPs [1]. ....	<b>17</b>
<b>Tabela 1.3</b> – Aplicações comuns dos nanocompósitos celulose/NPs metálicas [1].....	<b>23</b>

### Capítulo 2

<b>Tabela 2.1</b> – Nanocompósitos celulose/prata obtidos através de diferentes metodologias e teor final em prata determinado por análise elementar.....	<b>58</b>
<b>Tabela 2.2</b> – Efeito antibacteriano dos nanocompósitos celulose/prata. ....	<b>68</b>
<b>Tabela 2.3</b> – Liberação de Ag(I) dos nanocompósitos CV/Ag em função do tempo de imersão. ..	<b>74</b>
<b>Tabela 2.4</b> – Liberação de Ag(I) dos nanocompósitos CB/Ag em função do tempo de imersão. ..	<b>74</b>

### Capítulo 3

<b>Tabela 3.1</b> – Caracterização do filme de quitosano e dos derivados e respectivos nanocompósitos com Ag. ....	<b>88</b>
<b>Tabela 3.2</b> – Teste de halo. Inibição da <i>S. aureus</i> pelo filme de CH e nanocompósitos CH/Ag. ....	<b>98</b>

### Capítulo 4

<b>Tabela 4.1</b> – Caracterização do filme de pululano e dos nanocompósitos PL/Ag. ....	<b>116</b>
<b>Tabela 4.2</b> – Percentagem de inibição do crescimento fúngico (FGI) dos nanocompósitos PL/Ag no crescimento do <i>A. niger</i> . ....	<b>120</b>

### Capítulo 5

<b>Tabela 5.1</b> – Nanocompósitos celulose/Cu analisados e correspondente teor final em cobre. ....	<b>152</b>
--	------------





# *Capítulo 1*

## ***INTRODUÇÃO GERAL***

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Enquadramento deste trabalho .....	4
1.2 Nanocompósitos.....	6
1.2.1 Classificação de nanocompósitos .....	7
1.2.2 Nanocompósitos poliméricos com NPs.....	9
1.2.3 Bionanocompósitos .....	11
1.3 Nanopartículas como cargas inorgânicas em bionanocompósitos .....	13
1.3.1 Nanopartículas metálicas.....	14
1.4 Bionanocompósitos celulose/NPs metálicas.....	16
1.4.1 Estratégias de preparação .....	16
1.4.1.1 Mistura dos componentes.....	16
1.4.1.2 Redução <i>in situ</i> dos sais metálicos .....	17
Adição de agentes redutores externos .....	18
Redução dos sais metálicos pelos grupos redutores da celulose .....	19
Crescimento foto-induzido das NPs usando irradiação .....	20
1.4.1.3 Pós-deposição das NPs previamente sintetizadas .....	20
1.4.1.4 Outras metodologias .....	21
1.4.2 NPs metálicas como cargas em nanocompósitos celulósicos e respectivas aplicações ....	22
1.4.2.1 Prata .....	22
1.4.2.2 Ouro .....	24
1.4.2.3 Cobre .....	25

1.4.2.4 Platina.....	27
1.4.2.5 Cobalto.....	28
1.4.2.6 Ligas metálicas.....	28
1.5 Atividade antimicrobiana de NPs metálicas .....	29
1.5.1 Atividade antibacteriana.....	32
1.5.2 Atividade antifúngica.....	34
1.6 Objetivos do trabalho .....	37
1.7 Referências .....	39

## ***1.1 Enquadramento deste trabalho***

A investigação em materiais nanoestruturados é uma área de desenvolvimento em crescimento rápido no domínio da Ciência e Engenharia de Materiais. Esta investigação interdisciplinar não representa apenas uma alternativa para a conceção de novos materiais como abre portas a aplicações promissoras numa multiplicidade de áreas, nomeadamente, ótica, catálise, eletrónica, mecânica, energia, ambiente, biologia e medicina. Os nanocompósitos são materiais que se destacam atualmente no estudo em novos materiais. De entre os vários tipos de nanocompósitos existentes, este trabalho foca materiais constituídos por nanopartículas (NPs) inorgânicas dispersas em matrizes de biopolímero [2, 3].

A aplicação de NPs inorgânicas nos materiais compósitos atraiu um enorme interesse devido às propriedades únicas evidenciadas por estes sistemas, normalmente distintas dos materiais macrocristalinos quimicamente análogos. Os recentes avanços na síntese e aplicação controlada deste tipo de partículas permitiu controlar/modular diversas características como por exemplo o tamanho, a forma e a sua modificação superficial. Estes progressos favoreceram o desenvolvimento de novos materiais onde propriedades distintas podem ser conferidas aos materiais finais [4, 5].

Entre a diversidade de nanoestruturas inorgânicas, nesta tese estudou-se a aplicação de NPs metálicas, nomeadamente de Ag, Au, e Cu. Esta escolha deveu-se às propriedades óticas que apresentam [6] mas principalmente à sua possível utilização como agentes antimicrobianos [7-9], aspeto crucial nesta investigação.

A incorporação das NPs metálicas em substratos sintéticos é já um processo recorrente, no entanto o uso de substratos de origem natural não tem sido tão estudado. Por conseguinte, a utilização de biopolímeros como a celulose, o amido, o alginato, o pululano, o dextrano, o carragenano e o quitosano, entre outros, tem ganho uma grande relevância. Este facto deve-se à sua natureza renovável e potencial biodegradabilidade, de modo a promover o desenvolvimento sustentável, e também à variedade de morfologias que podem ser exploradas, dependendo da funcionalidade prevista [10, 11].

Neste contexto, a ideia chave deste trabalho foi a preparação de diversos nanocompósitos com biopolímeros, que em circunstâncias específicas, possam substituir materiais convencionais. Os biopolímeros investigados foram a celulose (vegetal e bacteriana), o quitosano e o pululano devido às suas propriedades específicas e estruturais. No caso da celulose, além da sua abundância, destaca-se a larga utilização em materiais de embalagem, fibras têxteis, revestimentos, membranas de separação e, especificamente a celulose bacteriana, no campo da medicina [12-14]. No quitosano e respetivos derivados evidenciam-se as características filmogénicas e atividade

antimicrobiana, propriedades bastante interessantes do ponto de vista tecnológico e com aplicabilidade comercial, desde o tratamento de águas residuais à indústria alimentar, cosmética e biomédica ou farmacêutica [15, 16]. O pululano foi selecionado devido à capacidade de obtenção de filmes transparentes e termicamente estáveis que podem ser usados em materiais de embalagem, processamento de alimentos e em diversas aplicações farmacêuticas [17].

No laboratório do CICECO e Departamento de Química da Universidade de Aveiro têm sido realizados diversos trabalhos na síntese de NPs metálicas como o Au [18], Ag [19] ou mesmo outras NPs inorgânicas como o  $\text{TiO}_2$  [20, 21] e a  $\text{SiO}_2$  [22]. Estes estudos realizados na presença de fibras celulósicas recorrendo a diferentes estratégias, nomeadamente à síntese *in situ* e à pós-deposição, demonstrou que este tipo de substratos pode servir eficazmente como matrizes potencialmente biodegradáveis e não tóxicas para a formação/deposição de diferentes tipos de NPs.

Os estudos realizados mostraram que a preparação de materiais compósitos e filmes transparentes à base de quitosano [23-25], de derivados de quitosano modificados quimicamente [26], assim como de pululano [27, 28], é uma abordagem simples e atrativa no desenvolvimento de novos materiais baseados nestes biopolímeros.

Seguidamente apresenta-se uma revisão dos principais conceitos subjacentes ao trabalho desenvolvido para esta tese assim como serão apresentados alguns dos desenvolvimentos recentes nesta área. Será discutido o estado da arte no que respeita à evolução dos nanocompósitos de matriz polimérica e mais concretamente dos bionanocompósitos. As diferentes estratégias preparativas usadas na preparação de bionanocompósitos com distintas NPs metálicas e respetivas aplicações serão discutidas com exemplos elucidativos.

Devido à extensa literatura sobre estes tópicos, a introdução geral dedicada aos bionanocompósitos foca o tipo de materiais compósitos investigados neste trabalho. A caracterização mais detalhada de cada biopolímero e a revisão dos trabalhos publicados por outros grupos de investigação, em cada tipo específico de nanocompósitos preparados ao longo deste trabalho, será apresentada na introdução de cada capítulo.

## 1.2 Nanocompósitos

Os nanocompósitos são materiais promissores para uma diversidade de aplicações devido às propriedades dos seus componentes e muitas vezes às que resultam da combinação de diferentes componentes. O interesse nestes materiais está também relacionado com a preparação de estruturas multifuncionais formadas por mistura de diferentes componentes [29].

As primeiras referências a “nanocompósitos” datam de há três décadas por Roy, Komarneni e colaboradores para descreverem nanomateriais heterogêneos obtidos através do processo sol-gel [30, 31] e a A. Kelly relativamente ao desenvolvimento de novos materiais e métodos de processamento [32]. Nestes primeiros estudos a definição referia-se a compósitos com mais de uma fase sólida onde pelo menos uma dimensão estava na gama nanométrica e normalmente todas as fases sólidas estavam na gama entre 1 e 20 nm [31]. Entretanto a definição tornou-se mais abrangente e inclui materiais com dimensões até tipicamente 100 nm.

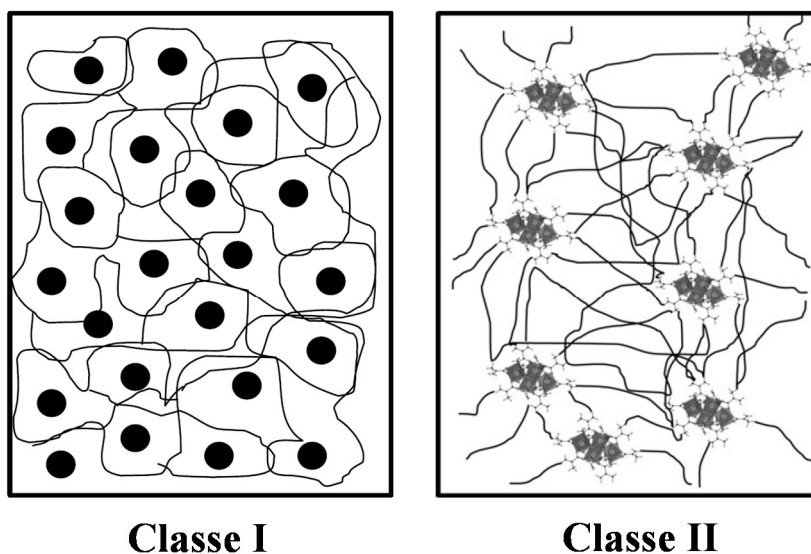
Desde estas primeiras publicações, a área dos nanocompósitos sofreu grandes desenvolvimentos em vários aspetos devido principalmente a avanços tecnológicos [33]. Uma definição mais recente classifica os compósitos como uma classe de materiais resultantes da combinação de dois ou mais componentes de fases distintas (orgânica, cerâmica ou metálica), sendo os nanocompósitos caracterizados por pelo menos um dos componentes apresentar tipicamente dimensões na gama nanométrica (1-100 nm) [34].

No entanto, esta definição não é única e têm sido propostas outras por investigadores, organizações nacionais e organismos internacionais. De acordo com a IUPAC (2007), um nanocompósito é um composto no qual pelo menos uma fase tem uma dimensão na ordem dos nanómetros. Um compósito é definido como um material com vários componentes compreendendo fases distintas (não gasosas) em que pelo menos uma das fases é contínua. No entanto a própria definição de nanomaterial tem sido amplamente discutida. Parâmetros como o tamanho, a distribuição de tamanhos, a área superficial específica, a modificação superficial, entre outras características físico-químicas influenciam as suas propriedades [35]. Em finais de 2011, a Comissão Europeia, baseada em pareceres científicos do Comité Científico dos Riscos para a Saúde Emergentes e Recentemente Identificados e do Centro Comum de Investigação, estabeleceu a seguinte definição. Um nanomaterial é definido como “um material natural, produzido acidentalmente ou fabricado que contém partículas soltas, agregadas ou aglomeradas, no qual 50% ou mais das partículas apresentem, na distribuição de tamanhos, uma ou mais dimensões externas no intervalo de 1 nm a 100 nm”. Em casos específicos, devido a preocupações ambientais, de segurança, de saúde ou de competitividade, o limite da distribuição de tamanho (50%) pode ser substituída por um limiar entre 1 e 50 %. Segundo a Comissão Europeia e contrariamente ao

definido acima, fulerenos, grafeno e nanotubos de carbono de parede única com uma ou mais dimensões externas inferiores a 1 nm devem ser considerados como nanomateriais [36]. Este passo permitiu definir, de um ponto de vista legislativo, claramente os materiais para os quais é necessário um tratamento especial e uma legislação específica. É de salientar que a definição será revista pela Comissão Europeia em 2014 à luz dos progressos técnicos e científicos [36].

### 1.2.1 Classificação de nanocompósitos

As propriedades dos nanocompósitos (algumas vezes chamados de híbridos orgânicos-inorgânicos) podem não resultar apenas da soma das contribuições individuais de ambas as fases mas de efeitos sinérgicos que possam ocorrer. Devido a este facto é necessário considerar o papel relevante da interface uma vez que controla propriedades como a transparência do material, a homogeneidade química e a estabilidade [2, 3]. A natureza da interface é uma característica usada para dividir este tipo de materiais em duas classes distintas (Figura 1.1) [3, 4].



**Figura 1.1**– Representação esquemática das duas classes de materiais híbridos [37].

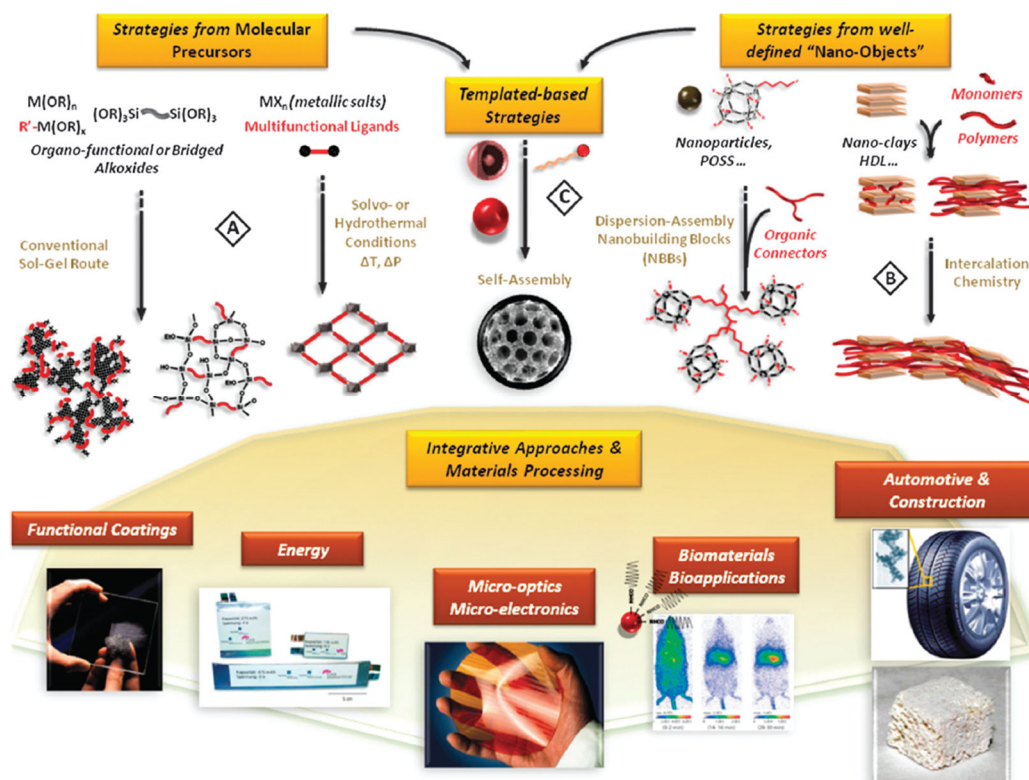
De acordo com Sanchez *et al.* [2-4, 38], os materiais híbridos podem ser da *classe I*, em que os componentes orgânicos e inorgânicos estão ligados por interações relativamente fracas (do tipo Van der Waals, pontes de hidrogénio ou interações eletrostáticas). Nos materiais da *classe II* as duas fases estão, pelo menos parcialmente, ligadas entre si através de ligações químicas fortes caracterizadas por uma forte sobreposição orbital (do tipo covalente). A fronteira entre estas duas classes é no entanto ténue, surgindo materiais que apresentam características comuns a ambas [39].

Independentemente da natureza da interface entre os seus constituintes, uma segunda característica usada na classificação de nanocompósitos consiste na sua divisão segundo as vias químicas usadas na sua preparação [2-4]. Têm sido discutidas várias estratégias gerais sendo de destacar o trabalho realizado por Sanchez e colaboradores [2-4, 38, 40-42]. A Figura 1.2 apresenta esquematicamente as estratégias gerais usadas para a preparação de uma gama ampla de materiais. Estas abordagens são divididas em três vias químicas principais:

A *via A* corresponde a abordagens típicas da *soft chemistry* que incluem a química de sol-gel, o uso de precursores específicos e multifuncionais e a síntese hidrotérmica, incluindo a síntese de polímeros de coordenação como os MOFs (*Metal-Organic Frameworks*). A *via B* corresponde à hibridização de “nanoblocos” bem definidos (através da montagem ou intercalação ou então intercalação e dispersão) permitindo obter uma melhor definição do componente inorgânico e caracterização dos materiais finais. Estes nanoblocos são preformados e escolhidos de forma a serem capazes de manter a sua integridade físico-química no material final. A *via C* corresponde a procedimentos baseados na “automontagem” de moléculas anfifílicas e polímeros agrupados através da polimerização sol-gel. Esta via explora a organização do crescimento de redes inorgânicas ou híbridos modelados por agentes tensioativos orgânicos formando materiais nanoporosos com um elevado grau organizacional. Outra abordagem que pode ser seguida corresponde à *via D* que corresponde à combinação entre as *vias A, B e C*. Este procedimento permite a construção de materiais organizados hierarquicamente em termos de estrutura e funções [3, 4].

Atualmente estes procedimentos de síntese em conjunto com abordagens *top-down* tal como o *electrospinning*, jato de tinta, processamento de plasma ou diversos tipos de litografia permitem projetar e construir materiais compósitos cada vez mais sofisticados e funcionais. Estes desenvolvimentos terão impacto em importantes domínios de aplicação como os associados à energia, o meio ambiente e desenvolvimento sustentável, biologia e ciências médicas, ciências e técnicas de informação (escrita, transferência e leitura), habitação e conforto pessoal [3]. Alguns produtos comerciais correspondentes aos desenvolvimentos nestas áreas são mostrados na parte inferior da Figura 1.2.





**Figura 1.2** – Representação esquemática das principais vias químicas usadas na preparação de materiais híbridos orgânico-inorgânico [3].

### 1.2.2 Nanocompósitos poliméricos com NPs

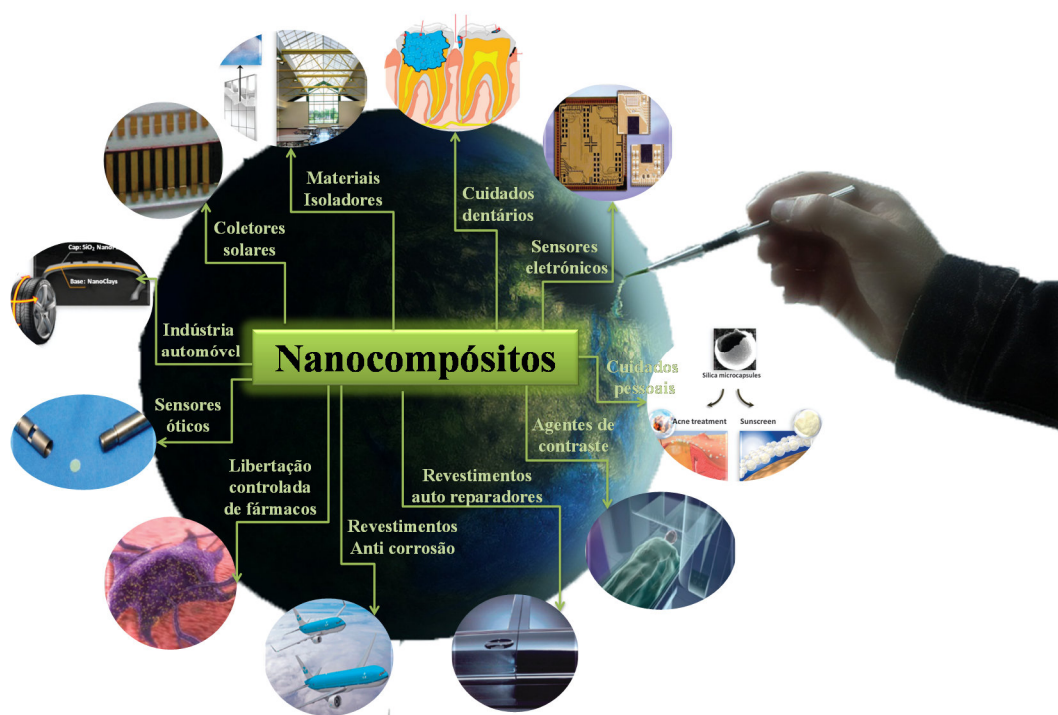
Nos nanocompósitos cada componente desempenha uma função bem definida dentro da estrutura compósita. Normalmente, a fase inorgânica confere propriedades funcionais específicas (ópticas, eletrônicas, magnéticas e/ou mecânicas) que podem ser modeladas. A fase orgânica (de salientar o elevado número de moléculas e estruturas orgânicas, naturais e sintéticas, disponíveis comercialmente) controla a reatividade e estabilidade da fase inorgânica proporcionando diversas interfaces [42].

A mistura de polímeros com diferentes NPs de modo a preparar materiais compósitos veio abrir novas perspectivas no desenvolvimento de materiais com propriedades novas e/ou melhoradas. Porém, a incorporação de NPs em polímeros de forma a preparar materiais compósitos é efetuada há décadas. Um exemplo é a preparação de pneus na indústria automóvel através da mistura de carbono negro, óxido de zinco e/ou partículas de sulfato de magnésio e borracha vulcanizada [43].

O desenvolvimento científico aliado aos recentes avanços tecnológicos levou ao aparecimento de novos métodos para a síntese controlada de NPs. A disponibilidade de NPs com

forma e tamanho precisos como os fulerenos, os nanotubos de carbono (CNTs), as NPs metálicas entre outras, em conjunto com o desenvolvimento de novas técnicas de análise (por exemplo o SEM, TEM e AFM), estimularam o estudo do efeito destas características sobre as propriedades finais dos nanocompósitos formados [43].

Estes avanços recentes na produção de materiais nanoestruturados com novas propriedades levaram à criação de materiais multifuncionais através da conceção de estruturas na escala nanométrica. O estudo de nanocompósitos tornou-se claramente um campo de pesquisa abrangente que produz materiais avançados e de elevado valor acrescentado, oferecendo uma vasta gama de possibilidades para o desenvolvimento de materiais adaptados às necessidades existentes [4, 38]. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos diversos nanocompósitos, maioritariamente com base em polímeros sintéticos, sob a forma de plásticos, fibras e borrachas sintéticas. A aplicação comercial dos nanocompósitos em diversas áreas, como mostra a Figura 1.3, é já uma realidade [3]. Estes materiais de base polimérica são usados numa multiplicidade de aplicações nomeadamente na área alimentar como material de embalagem, na agricultura, na construção e na medicina para o desenvolvimento de novos dispositivos médicos [44].

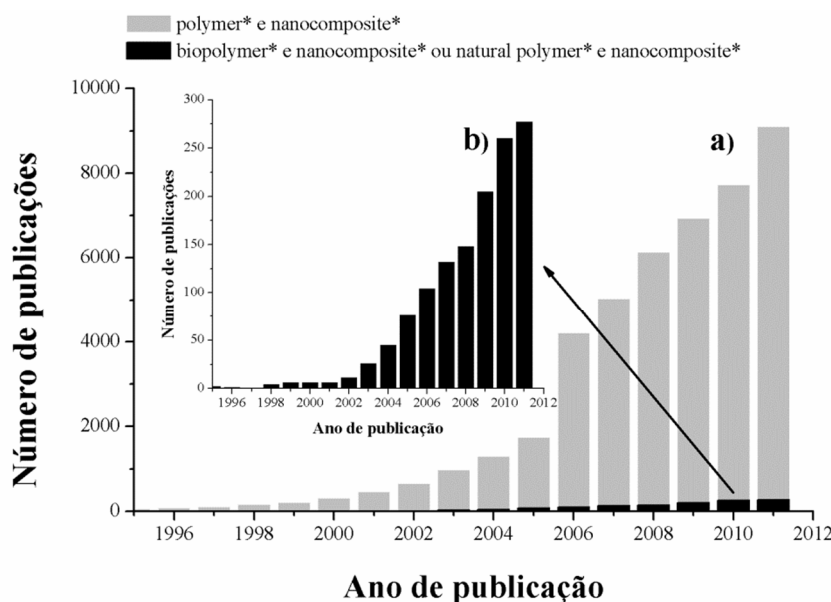


**Figura 1.3** – Exemplos de aplicação prática de nanocompósitos de base polimérica (adaptado de [3]).

No futuro a aplicação prática destes materiais será ainda maior pois surgem novas, e cada vez mais rigorosas, exigências de mercado no que respeita à melhoria dos níveis de sofisticação, de miniaturização e de maior harmonia entre o ambiente e a atividade humana [4, 38].

### 1.2.3 Bionanocompósitos

O desenvolvimento de nanocompósitos com base em diferentes tipos de matrizes poliméricas, nomeadamente sintéticas, tem sido objeto de uma investigação intensa. No entanto, estudos análogos usando polímeros de origem natural é consideravelmente menor [44, 45], como ilustra a Figura 1.4, onde se observa o número de publicações nos últimos quinze anos nestas duas áreas de pesquisa. Apesar deste facto, tem-se verificado um aumento significativo dos trabalhos publicados na preparação e caracterização de nanocompósitos à base de biopolímeros.



**Figura 1.4** – Número de publicações por ano dos trabalhos sobre: a) nanocompósitos poliméricos e b) nanocompósitos à base de biopolímeros. Dados recolhidos a partir de ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup> [46].

O interesse nos biopolímeros foi inicialmente desencadeado por dois fatores: a elevada preocupação no desenvolvimento sustentável, uma vez que a matéria orgânica de origem biológica é considerada um recurso renovável, de baixo custo e impacto ambiental limitado; e o esforço na direção de abordagens biomiméticas/bioinspiradas com base em arranjos hierárquicos entre os componentes orgânicos e inorgânicos existentes em nanocompósitos naturais [47, 48]. Alguns exemplos de nanocompósitos naturais encontrados na Natureza são o nácar (estruturas de camadas de aragonite cimentada por proteínas como a queratina, o colagénio e a elastina) das pérolas e

conchas, o marfim, os ossos e o esmalte dos dentes [48, 49]. A escassez progressiva dos combustíveis fósseis com consequente aumento de preços, aliado às crescentes restrições ambientais foram outros fatores que impulsionaram a procura de fontes alternativas para o desenvolvimento de novos materiais de modo a garantir um desenvolvimento sustentável [44, 47]. Esta classe de materiais formada pela combinação de polímeros naturais com estruturas inorgânicas exibindo pelo menos uma dimensão na escala nanométrica pode ser denominada de bionanocompósitos [48].

Nos últimos anos tem sido desenvolvida uma grande variedade de materiais baseados em biopolímeros assim como polímeros biodegradáveis derivados de recursos renováveis. Estes polímeros biodegradáveis podem ser classificados em três classes de acordo com a sua origem [44]:

- (1) Poliésteres sintéticos, nomeadamente poliésteres alifáticos, tais como o ácido polilático (PLA), a policaprolactona (PCL), o poli(p-dioxanona) (PPDO), o poli(succinato de butileno) (PBS) e o poli(succinato de etileno) (PES);
- (2) Poliésteres produzidos por micro-organismos: diferentes tipos de polihidroxialcanoatos incluindo o poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) e o poli- $\beta$ -hidroxibutirato-co- $\beta$ -hidroxivalerato (PHBV);
- (3) Polímeros provenientes de recursos naturais como o amido, a celulose, a quitina, o quitosano, a lenhina entre outros.

A importância desta classe de materiais resulta do seu uso em áreas relevantes, principalmente na medicina regenerativa e na libertação controlada de fármacos onde o uso de materiais biocompatíveis é normalmente um requisito. Além da potencial biocompatibilidade estes materiais apresentam outras propriedades como a osteocondutividade, facilitando a proliferação de células para o crescimento de novos tecidos ósseos [48]. O amido, a celulose (e derivados) e o PLA têm sido os polímeros mais usados na preparação de bionanocompósitos [44].

Embora o desenvolvimento de bionanocompósitos tenha aumentado e evoluído nos últimos anos, os biopolímeros estão longe de conseguir substituir totalmente os polímeros sintéticos derivados do petróleo. Este facto deve-se principalmente às propriedades desfavoráveis destes materiais ao nível das propriedades mecânicas (apesar de não todos) e elevada hidrofiliabilidade, o que limita a sua aplicação em diversas áreas. Deste modo, é compreensível a necessidade de funcionalização e modificação destes biopolímeros. O recurso à nanotecnologia, nomeadamente incorporação de NPs inorgânicas, tem sido um dos caminhos usados no desenvolvimento de novos bionanocompósitos tendo como objetivo o melhoramento do desempenho dos materiais obtidos [44, 50]. A Tabela 1.1 apresenta algumas das principais vantagens e desvantagens do uso de biopolímeros e NPs inorgânicas.

**Tabela 1.1** – Vantagens e desvantagens da preparação de nanocompósitos com base em biopolímeros e NPs inorgânicas.

	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>NPs inorgânicas</b>	Propriedades funcionais (ópticas, magnéticas, condução, mecânicas e bioativas)  Estabilidade térmica, química e física  Funcionalização versátil da sua superfície	Interações adversas com os sistemas vivos  Condições de síntese rigorosas (pH, solventes orgânicos, temperatura e pressão)
<b>Biopolímeros</b>	Recurso renovável (impacto ambiental limitado e baixo custo)  Possibilidade de interações benéficas com os sistemas vivos  Diversidade estrutural e química  Estruturas organizadas hierarquicamente	Fraca resistência mecânica  Elevada taxa de degradação

### ***1.3 Nanopartículas como cargas inorgânicas em bionanocompósitos***

Nos últimos anos, verificou-se na Nanociência e na Nanotecnologia um enorme interesse na preparação e caracterização de diferentes NPs inorgânicas. Este facto deve-se a que NPs apresentam propriedades distintas por terem um tamanho superior aos átomos individualizados, mas ao mesmo tempo menor que os materiais macrocristalinos análogos. Este tipo de propriedades é decorrente da sua pequena dimensão e elevada área de superfície específica sendo, portanto, as propriedades físico-químicas ajustáveis através de outros parâmetros além da composição química [51, 52].

Estas propriedades distintas podem ter um papel importante na interação das NPs com os biopolímeros, tendo sido descritas alterações significativas nas propriedades do material final nomeadamente ao nível do comportamento mecânico e/ou térmico da matriz polimérica [53, 54]. Outro aspeto interessante, resultante da incorporação das NPs em distintos biopolímeros, consiste na introdução de novas propriedades na matriz, como sejam ópticas [18, 55], magnéticas [56], catalíticas [56], luminescentes [57] ou antibacterianas [58]. A utilização de NPs relativamente a cargas comerciais tem a vantagem de permitir o uso de menores quantidades para obter resultados superiores.

Hoje em dia são utilizadas várias nanoestruturas inorgânicas destacando-se, devido ao interesse comercial, as [59]:

- nanoestruturas de óxidos metálicos e vidros;
- nanoestruturas semicondutoras;
- nanoestruturas metálicas.

Durante os últimos anos foram feitos progressos significativos na síntese e caracterização da maioria destas nanoestruturas, estando descritas metodologias bem definidas para a síntese de NPs metálicas (Au, Ag, Cu), de NPs magnéticas ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , Co, FePt), de NPs de semicondutores (por exemplo: ZnS, CdS,  $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ), entre outras [51, 60]. Assim, diferentes tipos de NPs com diferente distribuição de tamanhos e composição química encontram-se disponíveis, facilitando a sua incorporação em distintas estruturas poliméricas, ampliando a aplicabilidade dos nanocompósitos em diversas áreas de pesquisa.

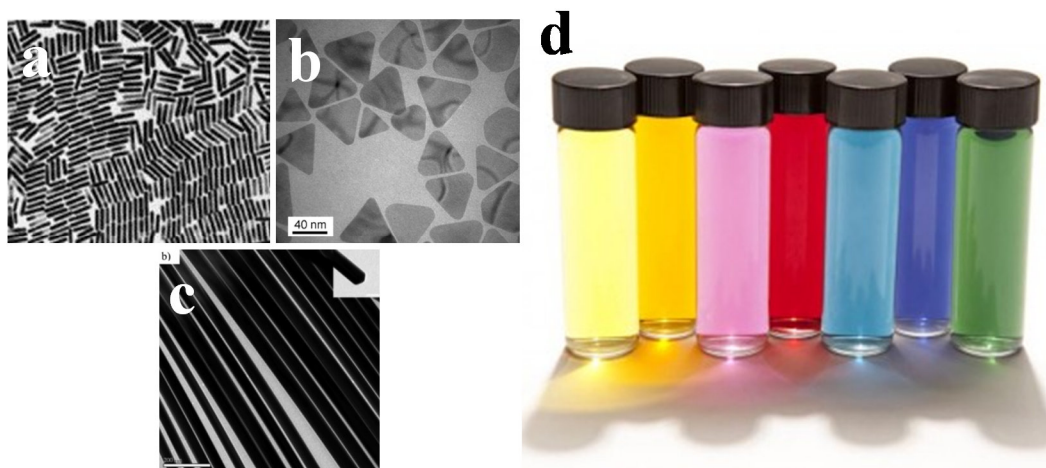
### 1.3.1 Nanopartículas metálicas

Entre as diversas NPs inorgânicas, este trabalho foca o uso de NPs metálicas. As NPs metálicas são utilizadas desde há séculos, havendo exemplos do seu uso em pigmentos decorativos pelo menos desde o tempo dos Romanos, como é exemplo a famosa taça de Lycurgus. Também são conhecidas referências à preparação de coloides de Au por Paracelsus, por volta de 1570, chamados de *aurum potabile* (ouro potável) e também de coloides de Ag denominados de *lune potabile* (prata potável), por Valentinus em 1677 [60].

Sob o ponto de vista científico, a preparação de NPs metálicas remonta ao século XIX quando Faraday descreveu a preparação de coloides de ouro monodispersos por redução de íons  $[\text{AuCl}_4]^-$  utilizando como agente de redução o fósforo em  $\text{CS}_2$  [60]. Michael Faraday [61] foi provavelmente o primeiro a atribuir corretamente as propriedades invulgares do ouro coloidal a efeitos de tamanho que ocorrem em partículas de dimensão muito pequena. Desde esse trabalho pioneiro, ocorreu um grande progresso na síntese, modificação e caracterização destes sistemas usando-se atualmente uma ampla multiplicidade de técnicas de modo a obterem-se NPs metálicas com tamanhos e morfologias de partículas distintas [62].

Um dos aspetos mais interessantes dos coloides metálicos é o comportamento ótico observado devido a alterações do tamanho e da forma das partículas. A variação de cor das soluções coloidais em função do tamanho de partícula deve-se à alteração na frequência de ressonância de plasmão de superfície (SPR). A SPR é a frequência à qual os eletrões de condução

do metal oscilam em fase com o campo elétrico incidente [52, 63]. Este efeito pode ser mais significativo devido à alteração da forma de partícula (por exemplo em nanobastonetes [64], nanoprismas [65] ou nanofios [66]) onde desvios à geometria esférica provocam mudanças drásticas de cor (Figura 1.5).



**Figura 1.5** – Diferentes morfologias de NPs nomeadamente nanobastonetes de Au (a), nanoprismas de Ag (b) e nanofios de Ag (c). Variação da cor da solução coloidal de NPs de Au e Ag em função do tamanho e da morfologia (d); da direita para a esquerda – nanoesferas de Ag (80 nm), nanoesferas de Ag (20 nm), nanoesferas de Au (40 nm), nanoesferas de Au (12 nm), nanodiscos de Ag (200 nm), nanodiscos de Ag (120 nm) e nanodiscos de Ag (60 nm) [64-67].

A SPR é característica de alguns coloides de metais e pode deduzir-se usando cálculos clássicos de dispersão de luz por partículas pequenas pela denominada teoria de Mie. Os metais Ag, Au e Cu apresentam ressonâncias de plasmão de superfície no visível, exibindo cores intensas na forma coloidal [52, 63]. Além destas propriedades óticas dependerem da morfologia das NPs, foi demonstrado que o meio nas quais estão dispersas [18], o índice de refração do meio dispersante [68] e a distância entre NPs adjacentes [69], são outros fatores que afetam as propriedades óticas dos coloides metálicos.

Nesta tese foram investigados três tipos de NPs metálicas como cargas em nanocompósitos: NPs de Ag (nanoesferas), NPs de Au (nanoesferas) e NPs de Cu (nanoesferas e nanofios). A escolha destas nanoestruturas deveu-se às suas propriedades óticas específicas e à possível aplicabilidade dos nanocompósitos contendo estas cargas como agentes antimicrobianos. No entanto, para esta aplicação salienta-se a prata uma vez que apresenta um efeito antimicrobiano bem conhecido.

## **1.4 Bionanocompósitos celulose/NPs metálicas**

No caso específico dos biopolímeros, este trabalho focou principalmente o uso da celulose, nomeadamente a celulose vegetal (CV) e a celulose bacteriana (CB), como substrato na preparação de nanocompósitos celulósicos com NPs de Ag e NPs de Cu. Nesse contexto, será apresentada seguidamente uma revisão de trabalhos realizados nesta área, focando-se os diversos nanocompósitos celulose/NPs metálicas descritos, as respetivas metodologias preparativas, assim como as principais aplicações. As metodologias aqui abordadas para matrizes de celulose podem ser adaptadas a outros biopolímeros, nomeadamente ao quitosano e ao pululano, substratos igualmente usados nesta investigação.

### **1.4.1 Estratégias de preparação**

Um aspeto fundamental a considerar na combinação de NPs metálicas com fibras de celulose é a metodologia preparativa a ser usada, tendo em conta as aplicações previstas. Naturalmente, essas metodologias devem possibilitar uma boa dispersão das NPs na matriz sem formação de grandes agregados (podem influenciar as propriedades finais dos materiais obtidos) e, tanto quanto possível, permitir obter uma distribuição estreita de tamanhos. Neste contexto, existe uma necessidade crescente de encontrar técnicas eficazes que permitam a produção em larga escala destes materiais e que ao mesmo tempo mantenham o controlo da dispersão de NPs na matriz celulósica. Foram desenvolvidas diversas metodologias de modo a ligar as NPs metálicas e as fibras de celulose. A Tabela 1.2 mostra os vários métodos publicados para a preparação de nanocompósitos celulose/NPs metálicas.

#### **1.4.1.1 Mistura dos componentes**

A mistura de NPs inorgânicas e polímeros de modo a promover a obtenção de nanocompósitos homogéneos tem sido uma metodologia largamente utilizada, principalmente na indústria [43]. Embora este método tenha como grande vantagem a simplicidade, a utilização da celulose como matriz geralmente leva à aglomeração das NPs diminuindo os benefícios associados com a presença de cargas nanométricas individualizadas. Por exemplo, quando se misturam NPs de Ag com fibras de CV, a eficiência antibacteriana é inferior à prevista e descontínua ao longo do tempo [70]. Outra estratégia publicada foi a deposição de NPs de Ag e Au, por adição gota a gota dos respetivos coloides, em papel de filtro [71, 72]. Esta metodologia não leva a uma distribuição homogénea das NPs sobre os substratos de papel, ocorrendo a formação de agregados nos limites externos das gotículas durante o processo de secagem [73].



**Tabela 1.2** – Metodologias de preparação de nanocompósitos celulose/NPs [1].

Matriz celulósica	Metodologia	NPs metálicas
<b>Vegetal</b>	Mistura dos componentes	Ag [70, 71], Au [72]
	Grupos redutores da celulose	Ag [58, 74-78], Au [78, 79], Cu [80, 81], Pt [82, 83]
	Redução <i>in situ</i> Agentes redutores externos	Ag [19, 58, 70, 77, 84-86], Au [18, 77, 85, 87], Cu [80, 88, 89], Pt [53, 77, 85, 90], Co [56], Pd [77, 85]
	Redução por UV	Ag [58, 91, 92]
	Pós-deposição	Ag [58, 85], Au [18, 85], Cu [9], Pt [85], Pd [85]
	Preparação por micro-ondas	Ag [93-95]
	Modificação da superfície	Ag [96], Au [96-98]
<b>Bacteriana</b>	Grupos redutores da celulose	Ag [99]
	Redução <i>in situ</i> Agentes redutores externos	Ag [19, 43, 53, 58, 100-104], Au [18, 53, 105-107], Cu [108], Pt [53, 109], Co [110]
	Pós-deposição	Au [18]
	Redução por UV	Ag [58]
	Modificação da superfície	Ag [111]
<b>Nanofibrilada</b>	Difusão	Ag [58]
	Mistura dos componentes	Ag [57]
	Pós-deposição	Ag [112]

#### 1.4.1.2 Redução *in situ* de sais metálicos

A preparação de nanocompósitos através da redução *in situ* de sais metálicos em suspensões aquosas de celulose tem sido uma abordagem largamente estudada. Normalmente este método envolve a utilização de um sal metálico solúvel como precursor, um agente redutor e um estabilizante de modo a evitar a aglomeração. No entanto, a redução *in situ* pode ser aplicada sem a adição de um agente redutor externo. Os íons metálicos adsorvidos à celulose podem ser reduzidos a NPs metálicas pelos grupos redutores presentes nesta matriz ou outros resultantes do processo de branqueamento, como os carboxílicos. Neste caso, a estrutura singular das fibras de celulose constituem um substrato eficaz para a síntese *in situ* das NPs. Os grupos presentes na celulose não só retêm firmemente os íons metálicos sobre as fibras através de interações ião-dipolo como, após a redução, estabiliza as NPs através de interações com a sua superfície [77, 101]. Este processo apresenta vantagens em relação à mistura simples dos componentes. O papel de suporte

desempenhado pelas cadeias macromoleculares na síntese das NPs melhora a distribuição no interior da matriz e evita a formação de agregados. Ao mesmo tempo, as cadeias do biopolímero desempenham uma função relevante levando à obtenção de NPs metálicas com uma distribuição de tamanhos estreita e forma bem definida [113].

Na metodologia *in situ* podem ser seguidas três tipos distintos de abordagens para a redução dos sais metálicos, nomeadamente a adição de agentes redutores externos, a redução pelos grupos redutores da celulose e o crescimento por foto-indução usando radiação UV.

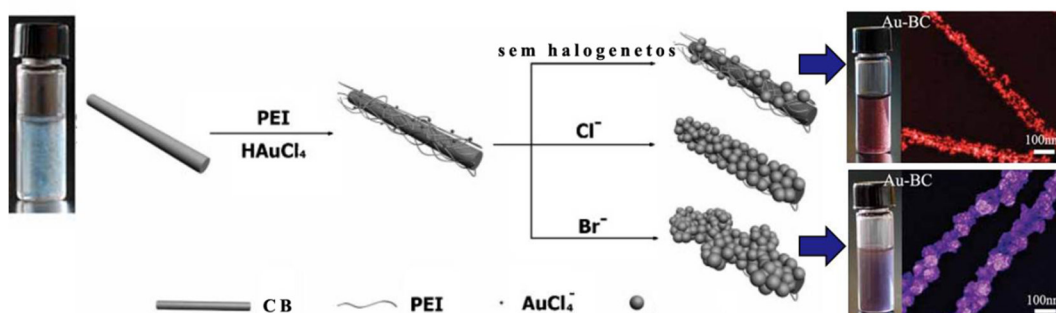
### ***Adição de agentes redutores externos***

A adição de agentes redutores externos é a abordagem mais usada entre os métodos *in situ* consistindo na retenção dos íons metálicos nas fibras seguindo-se a sua redução com um agente redutor externo. Neste procedimento o agente redutor também atua como co estabilizador das NPs metálicas (em conjunto com as fibras de celulose). Alguns exemplos destes agentes redutores são o borohidreto [114], o citrato [115] ou o ascorbato [116], também usados na preparação de dispersões coloidais estáveis [7].

O borohidreto de sódio tem sido usado na preparação de diversos nanocompósitos celulose/NPs metálicas sendo a distribuição de tamanhos das partículas ajustada através da razão molar entre a concentração de borohidreto e a concentração de sal metálico. Alguns trabalhos referem também o citrato de sódio como agente redutor e estabilizante na incorporação de NPs de Ag, nomeadamente em papel de filtro [84] e em fibras de CV e de CB [19].

O uso da hidrazina, hidroxilamina e ácido ascórbico em conjunto com a polivinilpirrolidona (PVP) ou outros agentes estabilizantes foi igualmente descrito por Ribeiro *et. al* [102]. Neste trabalho o ácido ascórbico atua como um agente redutor e os agentes estabilizantes como estabilizadores coloidais evitando a coalescência e controlando o tamanho de partícula. A redução *in situ* do Ag(I) pela trietanolamina foi descrita para a preparação de NPs esféricas (com um tamanho médio de 8,5 nm) bem dispersas na estrutura ultrafina da CB [103].

A redução de sais de Au(III) na matriz de celulose por fluxo de H<sub>2</sub> permitiu a preparação de bionanocompósitos com NPs com diâmetros médios de 2 nm [87]. O trabalho publicado por Zhang *et al.* [105] mostrou um método no qual em apenas um passo e em meio aquoso, a polietilenoimina (PEI) pode ser usada como agente redutor e ligante macromolecular. Neste caso, a espessura do revestimento de Au que rodeia as fibras de celulose pode ser controlado pela adição de distintos halogenetos (Figura 1.6).



**Figura 1.6** – Esquema da formação de nanocompósitos CB/Au usando o PEI (adaptado de [105]).

### ***Redução de sais metálicos pelos grupos redutores da celulose***

Uma via alternativa para a preparação *in situ* de nanocompósitos de base celulósica envolve os grupos redutores da celulose que além de reduzir os íons metálicos simultaneamente podem fixar as NPs nas fibras. Este processo apresenta a vantagem de não ser necessário nenhum agente redutor externo à mistura reacional, evitando assim possíveis interferências que estes possam vir a apresentar em determinadas aplicações, tais como em catálise [85].

Esta metodologia constitui uma abordagem, baseada na química verde, para a síntese de uma grande variedade de NPs metálicas em matrizes celulósicas onde não é usado agente redutor adicional ou estabilizantes coloidais. Após o trabalho de Kunitake *et al.* [77] que descreve a investigação pioneira utilizando fibras de CV, foi descrito mais recentemente o uso desta abordagem em fibras de CB nomeadamente para nanocompósitos CB/Au e CB/Ag [18, 58]. Esta estratégia também tem sido descrita para a síntese de nanocompósitos com base em fibras de algodão e NPs de Ag [74-76]. A durabilidade relativamente às lavagens destes materiais e as pequenas quantidades de Ag necessárias torna-a numa alternativa interessante para a produção de têxteis funcionais. A CB e géis de celulose nanoporosos têm sido utilizados como redutores e estabilizantes para diversas NPs metálicas usando métodos hidrotérmicos [53, 99].

Na área dos biocompósitos, recentemente tem sido dada relevância à aplicação de líquidos iónicos devido à sua capacidade de dissolver biopolímeros, como por exemplo a celulose. Este facto foi demonstrado na preparação de nanocompósitos celulose/Au [79]. O uso de celulose em conjunto com líquidos iónicos permite o controlo da morfologia das NPs num processo onde o líquido iónico é recuperado após a redução do metal. O uso de fibras não branqueadas apresenta como vantagem o facto de limitar a lixiviação devido à maior afinidade química entre este substrato e as NPs. Neste caso, as NPs são formadas diretamente sobre a superfície das fibras de CV, através de uma reação de oxidação-redução com a lenhina, não se observando no caso das fibras que não contêm lenhina [78].

### ***Crescimento foto-induzido de NPs usando irradiação***

A redução *in situ* utilizando radiação UV é um método simples para a deposição de NPs metálicas em fibras de celulose. A preparação dos nanocompósitos é baseada na foto-ativação da superfície da celulose por fotões, seguindo-se a redução química dos sais metálicos. Um mecanismo descrito refere a ativação destes grupos redutores na superfície das fibras pelos fotões da radiação UV [91]. O papel ativo e essencial dos grupos redutores neste mecanismo foi demonstrado através do uso de fibras de celulose onde estes grupos foram removidos, não se tendo verificado a formação de NPs na sua superfície [58]. Para nanocompósitos celulose/Ag [58, 91, 92] foi demonstrada a relevância de parâmetros como a intensidade da luz UV e o tempo de irradiação no controlo do teor de prata e da sua dispersão. As NPs de Ag formadas por este método tendem a revestir as fibras de celulose, agregando-se para tempos prolongados de irradiação. No caso do uso específico da CB, pode ocorrer a formação de NPs com morfologias distintas da esférica [58].

#### **1.4.1.3 Pós-deposição de NPs previamente sintetizadas**

A pós-deposição de NPs baseia-se na adsorção sequencial de espécies com cargas opostas sobre um substrato sólido, mediada frequentemente por polímeros iónicos [117]. Esta metodologia proporciona algumas vantagens em relação a outras, devido à possibilidade de um melhor controlo do teor inorgânico nos nanocompósitos finais, controlo eficiente do tamanho e forma das NPs e normalmente conduz a uma menor aglomeração das NPs previamente preparadas.

Para a síntese dos coloides de Ag, normalmente recorre-se à redução do Ag(I) com borohidreto de sódio e citrato de sódio. Este facto deve-se à facilidade e reprodutibilidade destes métodos uma vez que envolvem poucos passos, não necessitam de equipamentos específicos, usam normalmente a água como solvente, os agentes redutores são não-tóxicos, não são necessários agentes estabilizantes e permitem obter uma gama alargada de tamanhos e morfologias de NPs. A redução de Ag(I) em soluções aquosas através destas metodologias geralmente origina soluções coloidais de Ag com diâmetros de NPs variáveis. O uso de agente redutor forte como o borohidreto origina partículas monodispersas muito pequenas com uma distribuição estreita de tamanhos. No entanto, o uso de um redutor mais fraco, como o citrato, resulta numa velocidade de redução mais lenta levando à obtenção de tamanhos maiores com uma distribuição mais alargada. Em ambos os casos, as soluções coloidais apresentam uma coloração amarela com uma banda de absorção intensa, com máximo de absorção por volta dos 400 nm, devida à SPR das NPs de Ag [7].

Outras abordagens usando estes agentes redutores são aplicadas permitindo a obtenção de morfologias distintas da esférica ou o aumento do tamanho das NPs iniciais. O uso do citrato como

agente redutor é uma metodologia interessante para a preparação de NPs de Ag com outras formas (bastonetes, cubos, primas) através da alteração das condições de síntese [118]. Um procedimento alternativo para a obtenção controlada de diferentes gamas de tamanhos pode ser conseguido através de um processo em duas etapas, onde inicialmente é usado o borohidreto ou citrato para preparar pequenas NPs de Ag (designadas por sementes) seguindo-se o aumento de tamanho das mesmas, por redução com o citrato [114, 119].

As fibras de celulose dispersas em água são carregadas negativamente ao longo de um amplo intervalo de pH (2-10), devido à presença de grupos ionizáveis tais como os grupos carboxílicos e hidroxilo, resultantes do seu processamento químico ou de polissacarídeos presentes em menor quantidade como as glucuronoxilanas [120]. A deposição de NPs de Au em fibras celulósicas [18, 121] foi conseguida através do tratamento prévio das fibras, usando várias camadas alternadas de poli(cloreto de dialildimetilamónio) (PDDA) e poli(4-estireno sulfonato de sódio) (PSS). O uso de um polieletrólito com carga positiva na última camada favorece as interações electrostáticas das fibras com a superfície das NPs de Au carregadas negativamente. Esta metodologia foi aplicada na preparação de nanocompósitos de celulose nanofibrilada com NPs de Ag usando polieletrólitos distintos como ligantes macromoleculares [112]. Outro exemplo deste método é a modificação química da celulose com o cloreto de (2,3-epoxipropil)trimetilamónio (EPTAC) [85, 122]. Esta metodologia permitiu a modificação superficial dos substratos celulósicos com iões amónio, sendo vantajosa na ligação de NPs metálicas carregadas negativamente à superfície.

#### 1.4.1.4 Outras metodologias

A modificação química da celulose pode ser aplicada de modo a obter diferentes tipos de nanocompósitos com NPs metálicas. Neste contexto, um elevado número de derivados de celulose comuns como por exemplo a carboximetilcelulose, o acetato de celulose e a hidroxipropilcelulose têm sido referenciados [123-125]. No entanto, devido à extensão de trabalhos publicados no que diz respeito aos derivados de celulose, salienta-se seguidamente apenas aqueles que não usam diretamente este tipo de matrizes.

O processo de modificação de CB usando o radical TEMPO tem sido aplicado na oxidação seletiva dos grupos hidroxilo primários em C6, originando os correspondentes ácidos poliurónicos [111]. Neste trabalho a CB atua como um substrato eficiente no qual os grupos carboxilato possibilitam o ancoramento dos iões metálicos através de permuta iónica. A posterior redução destes catiões na superfície das nanofibras origina NPs metálicas com uma distribuição reduzida de tamanhos. Foi descrita também a modificação química dos grupos hidroxilo em grupos amínicos

que atuam como locais seletivos de coordenação [96] e a utilização da adsorção química espontânea em celulose modificada com tióis [97]. Neste último, a ligação química das NPs à superfície das fibras limita a sua dessorção, aumentando o tempo de vida dos materiais resultantes.

Gruber *et al.* [98] descreveu o fabrico de nanofios metálicos de tamanho controlado usando a celulose como molde biomolecular. Esta metodologia possibilitou o desenvolvimento de nanofios de ouro de tamanho variável, exibindo propriedades óticas singulares através da variação da espessura da camada de ouro. Outro método eficiente para a preparação de materiais com uma distribuição de NPs de Ag homogênea no interior da celulose descreve o tratamento da celulose com uma mistura de cloreto de lítio, *N,N*-dimetilacetamida e ácido ascórbico [93]. Mais recentemente, o mesmo grupo descreveu o uso de etilenoglicol como solvente e agente redutor [94]. A formação das NPs de Ag ocorre num passo único, com um tempo de reação reduzido e portanto com poupança energética assim como cinética e seletividade elevada [93, 126]. Um método semelhante foi aplicado num processo de preparação de nanocompósitos celulose/Ag em suspensões aquosas, no entanto neste caso a matriz de celulose é usada como agente redutor e estabilizante [95].

#### **1.4.2 NPs metálicas como cargas em nanocompósitos celulósicos e respetivas aplicações**

Atualmente existe uma grande diversidade de NPs metálicas que podem ser usadas como fase dispersa em bionanocompósitos com celulose. Nesta secção apresentam-se exemplos de trabalhos que têm sido desenvolvidos nesta área. As aplicações destes nanocompósitos estão relacionadas com o tipo específico de NPs embora possam surgir novas propriedades resultantes da associação das NPs metálicas e da celulose. A Tabela 1.3 resume as aplicações mais importantes dos nanocompósitos celulose/NPs fazendo-se seguidamente uma breve descrição para cada tipo de carga.

##### **1.4.2.1 Prata**

Hoje em dia, existe um interesse renovado em materiais com Ag devido nomeadamente à sua atividade antimicrobiana e ao aumento da resistência que as estirpes bacterianas têm desenvolvido em relação aos antibióticos convencionais. A elevada citotoxicidade das NPs de Ag para uma vasta gama de micro-organismos tais como bactérias e fungos é bem conhecida [127]. O desenvolvimento de vestuário de proteção médica ou materiais de embalagem com atividade antimicrobiana são exemplos desta tendência atual [84].

**Tabela 1.3** – Aplicações comuns dos nanocompósitos celulose/NPs metálicas [1].

NPs metálicas	Aplicação/área de aplicação	NPs metálicas	Aplicação/área de aplicação
<b>Ag</b>	Antifalsificação	<b>Au</b>	Biossensores
	Pele artificial		Catálise
	Embalagens alimentares		Condução
	Antimicrobiana		Dispositivos eletrônicos
	Tratamento de águas		Medicina (Libertação de fármacos)
	Curativos		Análise química (SERS)
	Biossensores		Têxteis
	Catálise		
	Indústria de Papel	<b>Cu</b>	Antimicrobiana
	Análise química (SERS)		Catálise
<b>Pt</b>	Têxteis	<b>Pd</b>	Catálise
	Catálise	<b>Co</b>	Eletrônica (atuadores)
	Eletrocatalise		Materiais magnéticos
	Fotocatalise		Dispositivos de análise química (microfluidos)
	Células de combustível		

Da mesma forma que para outras aplicações, é necessária uma boa dispersão das NPs de Ag na matriz de celulose de modo a não se verificar o decréscimo do efeito antimicrobiano. No entanto, outros parâmetros como a distribuição de tamanhos de partícula, o teor de Ag, a velocidade de libertação de Ag(I) e o tipo de interação com a superfície da celulose são igualmente importantes, influenciando a atividade antimicrobiana dos nanocompósitos [73, 113]. Devido à elevada capacidade de retenção de água e biocompatibilidade da CB, este substrato tem sido usado na preparação de materiais para curativos com atividade antimicrobiana aperfeiçoada em conjunto com NPs de Ag [101, 104]. Outros exemplos de nanocompósitos celulósicos com NPs de Ag incluem o desenvolvimento de materiais de embalagem para alimentos antibacterianos [84, 128] e papel bactericida para tratamento de água [70]. É de salientar a preocupação recente no estudo do processo de lixiviação destes materiais [74, 129].

As fibras de celulose podem ser modificadas quimicamente de modo a criar sítios reativos de modo a controlar a síntese das NPs de Ag. Os exemplos descritos de nanocompósitos com celulose nanofibrilada e NPs metálicas são escassos. A funcionalização deste substrato com *nanoclusters* de Ag fluorescentes por imersão dos filmes de nanocelulose em coloides de Ag protegidos com ácido

polimetacrílico [57] e a pós-deposição de NPs de Ag comerciais na nanocelulose através do uso de polieletrólitos de modo a facilitar o *scale up* [130], foram as únicas referências encontradas para este sistema.

Metais nanoestruturados, tais como Ag e Au, são conhecidos pela sua possível aplicação em SERS (*surface enhanced Raman spectroscopy*). O SERS refere-se à observação de que, para certas moléculas adsorvidas quimicamente em superfícies metálicas especialmente preparadas, se obtém um espectro de Raman no qual a intensidade de algumas bandas é intensificada tipicamente de  $10^6$ . Por esse motivo, a utilização conjunta destas NPs metálicas com celulose é de grande interesse no desenvolvimento de novas plataformas de detecção molecular [19]. Neste contexto, a preparação de materiais com base em celulose pode trazer várias vantagens como o fabrico de substratos analíticos na forma de papel de baixo custo e de fácil manuseamento. Estudos nesta temática demonstraram que o uso de nanocompósitos de CB/Ag são mais sensíveis à detecção de analitos, nomeadamente na biodetecção de aminoácidos, em relação aos análogos com CV [19]. O uso de papel de filtro com NPs de Ag demonstrou o potencial destes nanocompósitos como plataformas de SERS para o estudo de diversos analitos como o ácido *p*-hidroxibenzóico [71], nanotubos de carbono [131] e misturas binárias de 9-aminoacridina-acridina e acridina-quinacrina separadas por cromatografia em papel [132].

Uma metodologia simples e de baixo custo para o fabrico de células de combustível foi descrita com base em nanoestruturas de Ag e celulose [86]. Em meio básico, a remoção de calor do *template* em conjunto com a grafite melhora a redução de oxigênio.

#### 1.4.2.2 Ouro

As NPs de Au estão entre as partículas mais estudadas na área da Ciência de Materiais devido principalmente ao número elevado de métodos disponíveis para a preparação de colóides com tamanhos uniformes e forma bem definida. Têm sido preparadas NPs de Au estáveis nas quais as superfícies são eficientemente estabilizadas por aniões citrato na forma de hidrossol ou por alcanotóis quando são usados solventes orgânicos [133].

Os nanocompósitos celulose/Au são usados como catalisadores na oxidação da glucose [87]. Vários trabalhos referem que a boa dispersão das NPs de Au na celulose permite um contato efetivo com os reagentes tornando estes materiais eficientes na redução por exemplo do 4-nitrofenol [134]. Outra possibilidade interessante é a transformação de recursos naturais como a biomassa em produtos químicos de valor acrescentado. Recentemente foi demonstrada a possibilidade de conversão seletiva de celulose ou celobiose em ácido glucónico catalisada por NPs



de Au suportadas em polioxometalatos [135] ou nanotubos de carbono [136]. A aglomeração das NPs nos nanocompósitos celulósicos tem sido descrita como uma das principais limitações relativamente à atividade catalítica destes materiais.

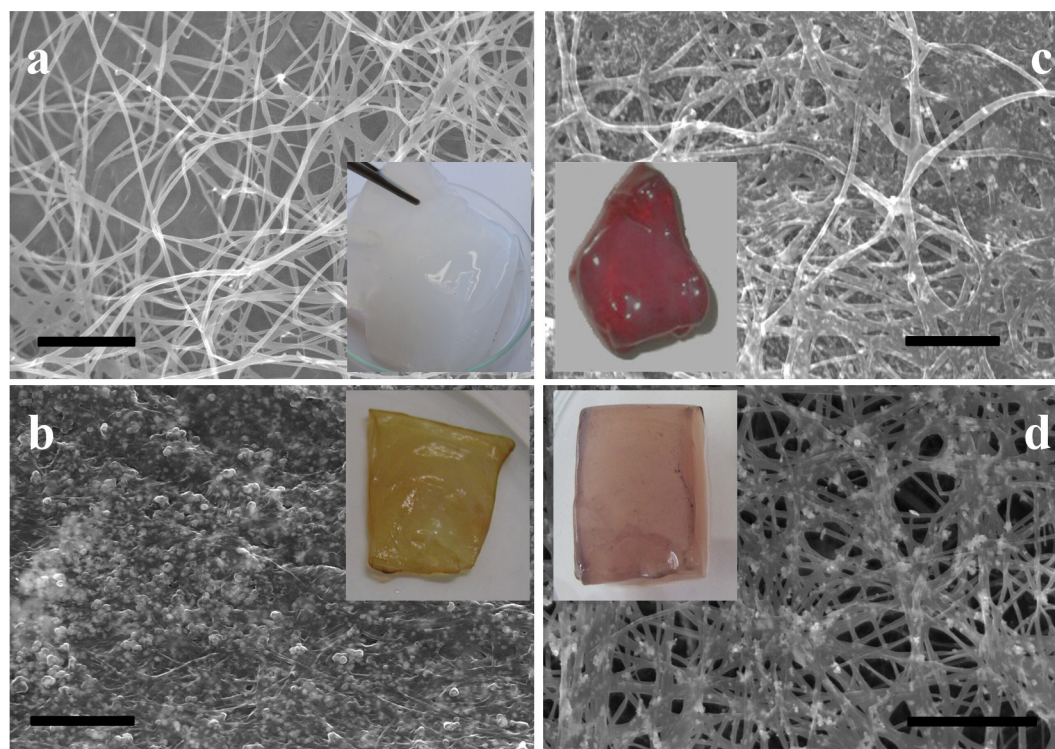
Os sensores à base de celulose têm despertado um elevado interesse em diversas áreas de aplicação como o diagnóstico médico, o controlo ambiental e a segurança alimentar. É importante desenvolver materiais que apresentem capacidade de transferência de eletrões, compatibilidade, estabilidade e fácil acessibilidade relativamente ao analito. Outras características desejáveis são uma área de superfície elevada para a imobilização dos analitos, resposta rápida, sensibilidade, reprodutibilidade elevada e que evitem interferências. Contudo, o desenvolvimento de um material único que inclua todas estas características é um grande desafio [107].

Os sensores celulósicos existentes são baratos, descartáveis e “amigos do ambiente”. Estes materiais transportam líquidos por ação capilar, sem necessidade de uma força adicional, permitindo a obtenção de valores reprodutíveis em superfícies rugosas e irregulares [137]. Nanocompósitos de CB/Au foram descritos como matrizes adequadas para a imobilização de enzimas, apresentando boa sensibilidade, baixo limite de deteção e resposta rápida para compostos como o peróxido de hidrogénio [105-107]. A aplicação prática destes nanocompósitos como sensores de glucose em amostras de sangue humano mostrou que os valores obtidos são concordantes com os valores obtidos em ensaios hospitalares [107].

Nanocompósitos condutores ou semicondutores contendo NPs de Au são muito interessantes em aplicações eletrónicas. Embora para muitas aplicações sejam necessárias dispersões uniformes das partículas, em alguns casos a agregação controlada é usada como uma vantagem. Filmes celulósicos condutores contendo NPs de Au foram preparados por automontagem mostrando condução elétrica para teores de ouro superiores a 20% (m/m) [133]. O mecanismo de condução nos filmes celulose/Au é dependente da resistividade do filme [138].

#### **1.4.2.3 Cobre**

As NPs de Cu são catalisadores eficientes na produção de hidrogénio [139]. Uma outra utilização das NPs de Cu diz respeito ao fabrico de materiais de baixa resistência elétrica, devido às suas propriedades condutoras notáveis [140]. Além destas aplicações, as NPs de Cu e os seus óxidos apresentaram um largo espectro de efeito biocida e atividade antimicrobiana em estudos de inibição do crescimento de bactérias, fungos e algas [9].



**Figura 1.7** – Imagens de SEM e fotografias digitais da CB (a) e respectivos nanocompósitos: CB/Ag (b), CB/Au (c) e CB/Cu (d) (barra de escala: 1,5  $\mu\text{m}$ ) [1].

Foram obtidos revestimentos antimicrobianos na celulose através da pós-deposição de NPs de Cu [9]. Neste processo foi realizado um pré-tratamento de fibras de algodão de modo a conferir carga superficial e promover a ligação dos íons cúpricos, seguindo-se a sua redução química de modo a criar revestimentos metálicos nanoestruturados. Os materiais resultantes mostraram uma eficácia elevada na morte da *Acinetobacter baumannii* (agente patogénico bastante resistente a fármacos). Em comparação com o nanocompósito de Ag análogo, não houve lixiviação das partículas.

Alguns trabalhos descrevem a aplicação de celulose microcristalina como substrato poroso para a deposição de íons de cobre [80, 89]. O agente redutor usado e a sua quantidade têm influência na distribuição de tamanhos e na fase obtida (NPs de Cu metálicas ou respetivos óxidos). A conversão do CuO em Cu usando a celulose como agente redutor sob condições alcalinas foi descrito como um processo “verde” para a produção de Cu com baixo custo energético [81]. Este processo permite a obtenção de produtos químicos de valor acrescentado como o ácido láctico e o ácido acético. Mary *et al.* [88] descreveu a possibilidade de usar as fibras celulósicas e o quitosano em conjunto. Neste caso, as fibras de celulose com quitosano foram usadas para imobilizar os íons de Cu, seguindo-se a sua redução com borohidreto de sódio de modo a obter NPs

de Cu. As NPs de Cu, ao contrário das NPs de Au e Ag, oxidam extensivamente sob condições ambiente. Apesar deste efeito prejudicial em termos de aplicações emergentes, como por exemplo o papel eletrónico, a oxidação pode ser limitada através da incorporação das NPs de Cu em substratos celulósicos [141]. Este assunto será discutido em pormenor no capítulo 5 desta tese.

#### **1.4.2.4 Platina**

A platina é um material usado em numerosas aplicações industriais, nomeadamente catalíticas, existindo atualmente uma vasta gama de trabalhos que descrevem vários métodos para a síntese de NPs deste metal [82]. Este metal é considerado o melhor catalisador para redução de oxigénio a água por ganho de quatro eletrões em meios ácidos, uma vez que proporciona uma estabilidade maior e um sobrepotencial menor [109]. A preparação de nanocompósitos de celulose/Pt envolve geralmente a redução de um sal de platina através da adição de um agente redutor externo ( $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{HCHO}$ , entre outros), na presença da celulose, podendo este substrato agir como um agente de direcionamento estrutural [53].

He *et al.* [90] descreveu um método para a obtenção de nanocompósitos de Pt e filmes de carbono amorfo através da carbonização das fibras de celulose. Os nanocompósitos celulose/NPs de Pt podem ser obtidos por redução com  $\text{NaBH}_4$  em condições hidrotérmicas e na presença de celulose nanoporosa [53]. Neste trabalho as NPs obtidas foram dispersas e estabilizadas na rede de fibras, não ocorrendo a sua agregação. Substratos celulósicos modificados na superfície com grupos amónio foram usados para preparar este tipo de materiais [85]. Neste método, a ligação das NPs de Pt carregadas negativamente nas fibras modificadas é conseguida através de interações eletrostáticas, provocando um elevado revestimento das fibras.

A preparação de membranas condutoras de protões termicamente estáveis por deposição *in situ* de NPs de Pt na CB, através de uma redução química com  $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{HCHO}$  em meio líquido, foi publicada por Yang *et al.* [109]. O material de cor preta obtido apresentou uma atividade eletrocatalítica elevada perspetivando-se a sua aplicação como membranas em células de combustível.

No caso dos nanocompósitos celulose/Pt é de salientar que os grupos redutores da celulose apresentam uma eficiência menor na redução dos precursores metálicos. Benaissi *et al.* [82] publicou um trabalho onde é estudada a redução do  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  a NPs de Pt em nanofibras de celulose cristalina de algodão através um sistema supercrítico de  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ . Nesta metodologia as fibras são usadas diretamente como agente de redução para a formação dos nanocompósitos celulose/Pt. Os mesmos autores descreveram a utilização de nanocristais de celulose (maior área de superfície por

unidade de peso em relação às fibras de CV tradicionais) para o mesmo objetivo [83]. Nesta variação a temperatura de reação pode ser reduzida de modo a obter NPs de Pt com diâmetros médios de 2 nm, com uma distribuição estreita de tamanho de partícula.

A incorporação de NPs de Pt com forma irregular dispersas em acetato de celulose, usando líquidos iônicos, originou nanocompósitos que exibem efeitos sinérgicos na intensificação da atividade e durabilidade do seu efeito catalítico [142]. Os autores sugerem que a presença dos líquidos iônicos provoca uma separação maior entre as macromoléculas de celulose resultando num material mais flexível e menos viscoso. Os nanocompósitos resultantes acabam por apresentar maior atividade catalítica quando comparados com as NPs de Pt dispersas individualmente no líquido iônico, apresentando interesse prático na hidrogenação do cicloexeno [142] e na produção de hidrogénio [143].

#### **1.4.2.5 Cobalto**

A deposição de NPs de Co em matrizes celulósicas tem sido um tópico de pesquisa nesta área devido principalmente à aplicação potencial destes nanocompósitos como materiais magnéticos. No entanto, devido à oxidação rápida destas NPs, o seu uso está associado à formação de ligas metálicas como por exemplo de FeCo, como será descrito na próxima secção. As propriedades magnéticas das NPs de Co são determinadas em grande medida pelos átomos à superfície. Para além disso, a cristalinidade, distribuição de tamanhos, forma das partículas e as NPs adjacentes afetam a resposta do material quando submetido a um campo magnético. Por conseguinte, a matriz na qual as NPs de Co são incorporadas, neste caso celulose, tem grande influência nas suas propriedades magnéticas assim como na distância entre elas [56].

No único trabalho encontrado para o sistema celulose/Co, os autores usaram duas metodologias químicas distintas de modo a estudarem o efeito sobre a estrutura e a morfologia das NPs de Co sintetizadas na matriz de celulose [56]. Na redução usando borohidreto foram obtidos materiais amorfos de Co-B ou de óxido de Co verificando-se um efeito adverso nas propriedades magnéticas em relação ao Co macrocristalino. No caso de ser usado o  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  no método de redução são obtidas NPs ferromagnéticas de Co bem ordenadas nas quais as propriedades magnéticas das amostras se assemelham às do Co macrocristalino.

#### **1.4.2.6 Ligas metálicas**

As propriedades de sistemas metálicos podem variar de forma significativa através da mistura dos componentes em compostos intermetálicos e ligas. A diversidade de composições e

estruturas das ligas metálicas pode originar não só novas propriedades mas também melhorar algumas propriedades dos componentes metálicos devido aos efeitos sinérgicos [144]. A associação de ligas metálicas (normalmente bimetálicas) à celulose origina materiais com estruturas e propriedades bem-definidas e controláveis. A nanoestrutura bimetálica de FeCo pode ser obtida utilizando a celulose, onde o hexacianoferrato de cobalto é usado como precursor [145]. As NPs de FeCo são depositadas na matriz de celulose através da redução em fase gasosa com  $H_2$  originando estruturas tubulares ocas simulando a morfologia inicial do precursor.

Aerogéis magnéticos podem ser obtidos usando as fibras de CV e CB, os quais podem ser compactados em papéis magnéticos rígidos [110]. As fibras atuam como moldes para o crescimento de NPs FeCo discretas formando um aerogel seco, leve, poroso, flexível e magnético com aplicação potencial em dispositivos como microfluídos e como atuadores na área da eletrônica. Foram também descritos nanocompósitos de PdCu em CB, em que as NPs de PdCu estão homogeneamente depositadas na superfície, que apresentam uma elevada atividade catalítica [146]. Embora o custo destes materiais tenha de ser considerado, estes materiais poderão ser interessantes para purificação de água, pois a liga PdCu é considerada o melhor catalisador para a desnitrificação de águas poluídas.

### ***1.5 Atividade antimicrobiana de NPs metálicas***

As NPs de Ag, Cu e Au, e respetivos bionanocompósitos apresentam um elevado número de aplicações, no entanto este trabalho apenas focou a sua aplicação como material antimicrobiano devido à forte citotoxicidade destas NPs metálicas para uma vasta gama de micro-organismos tais como bactérias e fungos [127].

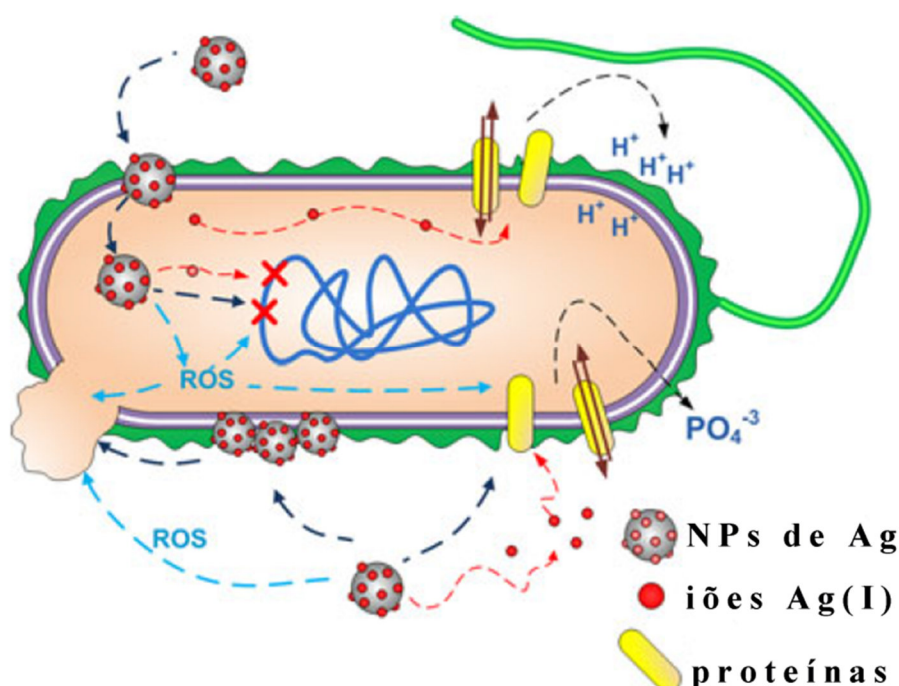
As propriedades antimicrobianas da prata e do cobre (tanto na forma de NPs ou iónica) são bastante conhecidas, sendo claramente a prata o material mais usado. No caso específico da prata, este metal é utilizado desde os Egípcios e amplamente na medicina moderna desde o início do século XX. Apesar da descoberta da penicilina e de outros antibióticos ter levado a uma diminuição do uso da prata em aplicações médicas, o desenvolvimento de novos compostos baseados neste metal não parou totalmente [147]. O aparecimento da sulfadiazina de prata(I) é um excelente exemplo pois é atualmente um dos agente antimicrobiano mais conhecidos e usado no tratamento de queimaduras graves [148]. No caso específico do cobre várias formas deste metal demonstraram atividade contra diversos micro-organismos, nomeadamente sob a forma de Cu(0), óxidos de Cu(I e II) e cobre iónico [9].

Após numerosos estudos desenvolvidos, o mecanismo associado ao efeito antimicrobiano destas NPs metálicas continua sem ser totalmente compreendido. Foram sugeridos diversos mecanismos com base nas alterações morfológicas e estruturais observadas em bactérias que contataram com estes metais [8]. A maioria dos estudos sugere que as NPs podem fixar-se na superfície das membranas celulares perturbando a permeabilidade e as funções respiratórias dos micro-organismos [7, 147]. É de consenso geral que, tanto as NPs de Ag [149, 150] como de Cu [88], libertam iões metálicos que podem ter uma contribuição adicional no efeito antimicrobiano. A libertação de iões, para a maioria dos autores, explica o mecanismo de ação das NPs, uma vez que o mecanismo é praticamente idêntico ao proposto para os iões metálicos. Alguns estudos recentes referem que a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) nas células devido a esta transferência de iões metálicos contribui também para este efeito [151].

Os ROS são subprodutos naturais do metabolismo respiratório dos organismos. Enquanto pequenos níveis podem ser controlados por moléculas antioxidantes existentes nas células, a produção em excesso pode produzir o *stress* oxidativo e a produção adicional de radicais livres pode atacar a membrana celular levando à sua rutura ou causar danos no ADN [152]. No caso das NPs metálicas estas podem atuar como catalisadores, originando ROS na presença de oxigénio dissolvido. Neste contexto, as NPs de Ag e Cu podem catalisar reações com o oxigénio levando à formação em excesso de radicais livres. Estudos realizados mostram o efeito de NPs de Ag na inibição das moléculas antioxidantes existentes nas células [127] assim como evidenciam a existência e a toxicidade dos radicais livres obtidos através destas NPs e da libertação dos seus iões [153]. Foi observado que a atividade antimicrobiana evidenciada pelas NPs de Ag foi anulada (especificamente para a *E. coli* e *S. aureus*) na presença de antioxidantes, sugerindo que o mecanismo está relacionado com a formação de radicais livres a partir da superfície das NPs de Ag que provocam danos na membrana celular [153].

No entanto, também pode ocorrer o dano direto da membrana celular pelas NPs. Smetana *et al.* [154] e Sondi *et al.* [155] demonstraram que NPs de Ag induzem a formação de “canais” nas membranas celulares podendo provocar a libertação do conteúdo celular. Outros estudos demonstraram que as NPs não interagem apenas com a membrana mas podem também penetrar dentro das células das bactérias [149, 152, 155]. O trabalho publicado por Gao *et al.* [156] é um exemplo que demonstra que este mecanismo não se baseia simplesmente na libertação de iões metálicos. Este estudo mostrou uma correlação entre a forma das NPs de óxido de cobre(I) e a sua atividade antimicrobiana sugerindo que a morte das bactérias pode ser induzida por interações específicas da superfície das NPs e dos micro-organismos (isto é, “contato-morte” como observado em polieletrólitos antimicrobianos [157]).

Os danos verificados nas paredes celulares podem ser causados pela interação das NPs com os compostos celulares contendo enxofre e fósforo uma vez que, por exemplo a prata, tem uma elevada afinidade para esse tipo de compostos [7]. Alguns trabalhos referem também a forte interação dos íons  $\text{Ag(I)}$  com grupos  $-\text{SH}$  disponíveis, causando a inativação das bactérias [158]. Estas interações das NPs com as membranas celulares acabam por evitar a replicação do ADN levando à morte dos micro-organismos (Figura 1.8) [150, 158]. É importante salientar que estudos proteómicos demonstraram, que no caso de NPs de Ag (tamanho médio de 9,3 nm), a concentração eficaz é a nível nanomolar, enquanto para os íons  $\text{Ag}^+$  ocorre a níveis micromolares [159, 160].



**Figura 1.8** – Esquema resumido das possíveis interações das NPs de Ag com células bacterianas. As NPs de Ag podem: (1) libertar íons  $\text{Ag(I)}$  e originar ROS, (2) interagir com as proteínas da membrana afetando as suas funções, (3) acumular-se na membrana celular afetando a sua permeabilidade e (4) entrar na célula onde pode originar ROS, libertar íons  $\text{Ag(I)}$  e afetar o ADN. As espécies ROS e íons  $\text{Ag(I)}$  podem também afetar o ADN, a membrana celular e as proteínas da membrana (adaptada de [152]).

Seguidamente far-se-á a subdivisão deste tópico, nomeadamente em atividade antibacteriana e antifúngica, de modo a salientar as diferenças entre os dois tópicos, descrevendo-se os desenvolvimentos mais recentes nestas áreas.

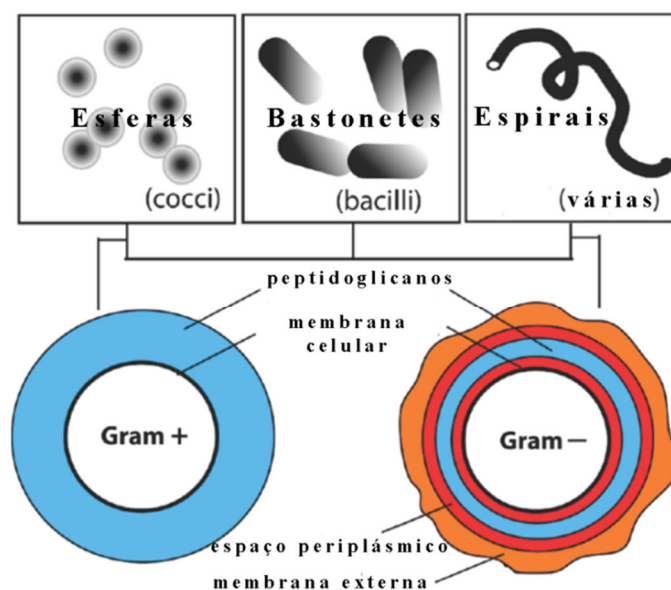


### 1.5.1 Atividade antibacteriana

O uso excessivo de antibióticos leva a que cada vez mais surjam novas estirpes de bactérias com níveis perigosos de resistência causando um problema sério de saúde pública [149].

As bactérias são protegidas por uma parede celular rígida composta por polissacarídeos e péptidos podendo ser divididas em dois grupos: Gram-negativas e Gram-positivas. Esta divisão é uma classificação geral para as bactérias baseada na estrutura da sua parede celular e resulta da resposta das bactérias à técnica de Gram. Neste teste as bactérias Gram-positivas mantêm a cor violeta do corante enquanto as Gram-negativas mudam para rosa ou vermelho.

A principal diferença entre estes dois tipos de bactérias é a composição da parede celular. As bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa e homogênea formada por uma camada de peptidoglicano muito entrelaçada, com cerca de 30 nm de espessura. Nas bactérias Gram-negativas, a camada de peptidoglicano é mais fina (entre 2 e 3 nm) e não é tão entrelaçada e, externamente a esta camada existe uma membrana externa assimétrica formada por proteínas, fosfolípidos e lipopolissacarídeos [149] (Figura 1.9).



**Figura 1.9** – Representação esquemática da estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas assim como as morfologias que podem apresentar (adaptada de [161]).

Esta característica acaba por ser muito importante na interação das NPs metálicas com as bactérias. Alguns estudos mostram que as bactérias do tipo Gram-negativo são normalmente mais afetadas provavelmente devido a interações eletrostáticas que ocorrem entre as paredes celulares das bactérias e as NPs [162]. No entanto, na literatura não existe consenso pois fatores como a



forma das bactérias, espécie, tamanho e forma das NPs, entre outros, influenciam a atividade antibacteriana.

O teor de NPs metálicas parece ser um fator determinante na atividade antibacteriana, uma vez que à medida que se aumenta o teor verifica-se o aumento da eficiência. Este valor varia em função da estirpe de bactéria testada como evidenciado por Marambio-Jones *et al.*[152]. Outro fator que influencia a atividade antibacteriana das NPs metálicas é o seu tamanho médio. A “ligação” das NPs às bactérias depende da área superficial disponível para a interação, pelo que o efeito das NPs é influenciado pela sua dimensão. As NPs de tamanhos mais reduzidos, tendo maior razão entre área superficial disponível e volume, mostram uma maior eficiência [147, 149, 163].

A dependência da forma das NPs na atividade antibacteriana foi demonstrada por Pal *et al.*[164] usando especificamente a *E. coli* (Gram-negativa). Através do estudo da superfície das bactérias, por microscopia eletrónica de transmissão, foi verificado que NPs com forma de nanodiscos triangulares apresentam atividades superiores a nanobastonetes e NPs esféricas. Este efeito foi justificado pela maior reatividade destas nanoestruturas devido à maior densidade atômica, sendo necessários teores de Ag de 1µg de nanodiscos, 12,5 µg de NPs esféricas e 50-100 µg de bastonetes para obter atividade antibacteriana similar.

A modificação superficial de nanoestruturas metálicas foi outra das características estudadas na atividade antibacteriana. Foi verificado que a atividade de NPs de Ag aumenta significativamente quando modificadas por tensioativos como o PVP ou o SDS, sendo este efeito explicado pelo efeito estabilizador destes compostos a nível da agregação das NPs. O tipo de polímero usado, o tamanho de cadeia e o modo de adsorção irá influenciar também a atividade obtida [147].

O facto mais importante a salientar na comparação com os antibióticos, é que o desenvolvimento de mecanismos de resistência das bactérias à prata iónica pode ser observado [147, 165]. No entanto, até ao momento, não foi publicado nenhum estudo onde se demonstre a resistência das bactérias ao uso de NPs de Ag como agente bactericida. Este facto é devido supostamente a diferenças nos mecanismos de ação antibacteriana das diversas formas de prata [166].

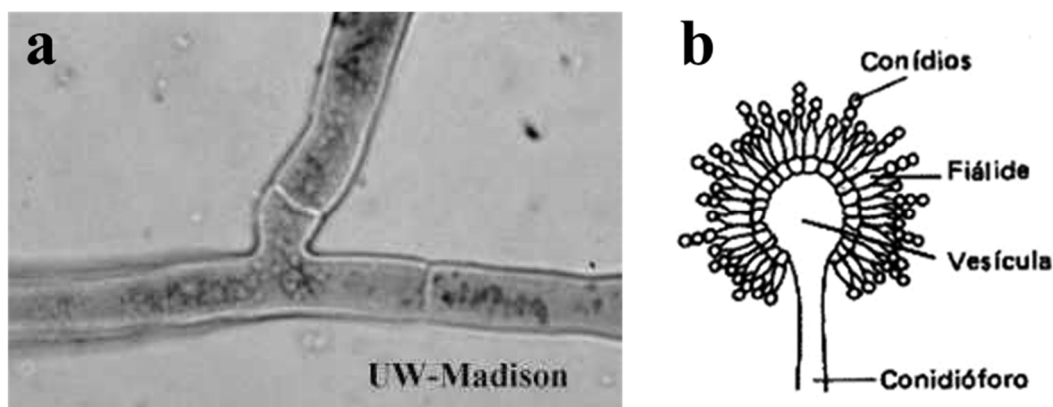
Atualmente a atividade antibacteriana das NPs metálicas é uma propriedade bastante explorada no desenvolvimento de novos materiais, principalmente para uso na área médica (hospitalar) e farmacêutica. A sua aplicação em revestimento de cateteres para retardar o desenvolvimento de micro-organismos, no aumento da atividade de antibióticos, em produtos de higiene incluindo cremes para o rosto, em suplementos de saúde, em cartuchos de filtração de água e de ar, entre muitos outros é uma realidade [7].

### 1.5.2 Atividade antifúngica

Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem a sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila, não têm celulose na sua parede celular (exceto alguns fungos aquáticos) e não armazenam amido como substância de reserva. Os fungos alimentam-se por absorção de matéria orgânica morta (saprófitos) ou através da absorção de nutrientes de hospedeiros vivos (parasitas), podendo também viver em simbiose com outros organismos. Estes organismos eucarióticos são multicelulares, na maioria das vezes (como os cogumelos e os bolores – classe em estudo), mas podem ser unicelulares (leveduras). Todos os fungos são heterotróficos não podendo fabricar matéria orgânica a partir do carbono inorgânico, pois não têm pigmentos fotossintéticos [167, 168].

Os fungos multicelulares são constituídos por uma série de filamentos em forma de tubo denominados hifas. O conjunto massificado de hifas designa-se por micélio [169]. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, funcionando como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes é chamado de micélio vegetativo, enquanto o que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo. Quando o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo. As hifas septadas têm paredes (septos) a separar os compartimentos celulares entre si (Figura 1.10a). Os septos possuem poros que permitem a comunicação, e mesmo o movimento de organitos, entre os citoplasmas adjacentes [168, 170].

A maioria dos fungos apresenta dois tipos de reprodução, nomeadamente a sexuada (conjugação entre dois micélios diferentes e ocorre em condições desfavoráveis) e assexuada. Na reprodução assexuada a reprodução ocorre através de fenómenos de fragmentação do micélio designando-se por gemiparidade em fungos unicelulares e por esporulação em fungos multicelulares. A esporulação implica a existência de estruturas especializadas na produção de esporos, formadas por hifas verticais, mais ou menos compactas, e separadas por septos do restante micélio (esporangióforos ou conidióforos) (Figura 1.10b). Os esporos são células especializadas na dispersão, sendo produzidos aos milhões e transportados pelo vento, até atingirem um substrato favorável, onde se desenvolvem num novo micélio. Estes esporos são geralmente libertados e podem permanecer viáveis durante longos períodos de tempo. Existem, igualmente, esporos de parede fina e envoltos por uma substância pegajosa que lhes permite aderir ao corpo de outros organismos espalhando-os pelo meio [170].



**Figura 1.10** – Imagem de microscopia de um micélio com hifas septadas (a) [168] e esquema de conídios de *Aspergillus* agrupados (b) [170].

Os fungos são fundamentais para a ecologia do planeta, atuando com as bactérias no processo de decomposição de matéria orgânica, sendo também importantes no fabrico de produtos de elevado consumo, como o álcool etílico, queijo e pão [167, 168, 170]. Os fungos também podem ser utilizados diretamente como alimentos e produzem inúmeros metabolitos utilizados na indústria, nomeadamente enzimas, ácidos, inseticidas e fungicidas [168]. Alguns estudos referem que estes micro-organismos podem ser usados na biossíntese, quer intra ou extracelular, de NPs metálicas como Ag ou Au [171, 172].

Apesar de todas estas associações vantajosas, alguns destes organismos podem provocar também enormes devastações, bastando referir que cerca de 30 a 40% das culturas agrícolas anuais são destruídas por fungos [168]. Doenças como a micose, as alergias ou o consumo de substâncias tóxicas produzidas por diferentes tipos de fungos são outros exemplos de efeitos prejudiciais deste tipo de organismos [168, 173]. Nos últimos anos, de igual modo ao verificado para as bactérias, tem sido observado um aumento da resistência dos fungos aos fungicidas convencionais, verificando-se especificamente o aumento drástico de infeções provocadas por espécies fúngicas oportunistas. Apesar da maioria destas infeções ser devida principalmente a espécies distintas de género *Aspergillus* e *Candida*, o espetro de fungos patogénicos tem-se diversificado [174]. Infeções de pele causadas por fungos, como espécies de género *Trichophyton* e *Candida*, têm-se tornado comuns, em particular, em doentes com cancro ou leucemia tratados por quimioterapia, uma vez que têm o sistema imunológico debilitado [175].

Os azóis e os polienos são as classes de compostos mais usados na terapêutica antifúngica, no entanto o aparecimento de resistência por parte de várias espécies ao fluconazol, mas também a elevada toxicidade da anfotericina B e de fungicidas sintéticos, tornou inevitável e urgente a procura de novos agentes antifúngicos [174, 176].

Muitos estudos têm demonstrado a elevada eficiência antimicrobiana da prata, no entanto dentro destes estudos, o seu efeito (e respetivo mecanismo) contra fungos patogénicos é bastante mais recente e menos estudado em relação ao seu efeito antibacteriano [177]. Apesar deste facto, o efeito da prata contra diversos fungos como em espécies de género *Candida* [175, 178-181], espécies de *Trichophyton mentagrophytes* [175], *Bipolaris sorokiniana* e *Magnaporthe grisea* [177] ou distintas espécies de género *Aspergillus* [135, 181], encontra-se descrito. É de salientar que nestes trabalhos, apenas os mais recentes começaram a referir o uso das NPs de Ag.

Apesar do mecanismo de ação das NPs de Ag em fungos também não ser totalmente compreendido, estes estudos demonstraram que tanto as NPs de Ag como a sua forma iónica reduzem o crescimento de fungos. A sua eficiência fungicida depende da espécie de fungo e das condições testadas (tempo, humidade, temperatura, ...) [177]. As NPs de Ag podem ligar-se diretamente e/ou penetrar nas membranas “matando” os esporos, sendo explicado em alguns trabalhos que o efeito antifúngico se deve principalmente à libertação de iões Ag(I) [177]. Outro estudo mostrou que as NPs de Ag podem exercer uma atividade antifúngica devido à perturbação da estrutura celular, inibindo o processo normal de crescimento do fungo devido à destruição da integridade das membranas [182].

Em resumo, a aplicação de NPs de Ag ou da sua forma iónica tem um grande potencial no desenvolvimento de novos materiais com aplicabilidade antifúngica. O desenvolvimento de materiais para o tratamento de infeções de pele, aplicações clínicas ou mesmo na indústria alimentar são apenas alguns exemplos das aplicações propostas em vários artigos [135, 175, 180, 181]. Naturalmente, neste tipo de materiais bem como em materiais análogos usando biopolímeros, deve-se ter em conta os efeitos adversos nomeadamente ao nível do impacto na saúde e no ambiente [183, 184].

## **1.6 Objetivos do trabalho**

De acordo com o contexto apresentado, o objetivo geral desta dissertação consistiu em estudar a preparação e caracterização de novos materiais compósitos constituídos por polímeros obtidos a partir de fontes renováveis e NPs metálicas. Diversas estratégias preparativas foram investigadas, nomeadamente a síntese *in situ* e a pós deposição das NPs previamente sintetizadas, usando como matrizes os biopolímeros celulose, quitosano e pululano. Como cargas dos bionanocompósitos investigaram-se NPs de Ag, Au e Cu.

Os materiais preparados foram caracterizados de modo a perceber a influência das diferentes nanofases e da sua morfologia nas propriedades apresentadas pelos nanocompósitos, para além do tipo de biopolímero usado e da respetiva metodologia de preparação. O objetivo foi perceber os fenómenos subjacentes a cada tipo de nanocompósito tendo em vista a sua potencial aplicação como materiais antimicrobianos com base em biopolímeros.

No capítulo 2 pretendeu-se investigar os aspetos fundamentais de nucleação e de crescimento de NPs de Ag em matrizes celulósicas (CV e CB) de modo a perceber como as diferenças estruturais entre estas duas matrizes afetam os nanocompósitos obtidos. A alteração da metodologia de síntese e dos respetivos teores de prata foram estudados de modo a perceber como a própria atividade antibacteriana é influenciada por estes parâmetros, estudando-se para o efeito diferentes espécies bacterianas. Com o objetivo de verificar a influência da libertação de Ag(I) no mecanismo antibacteriano das NPs de Ag foi também estudada a libertação catiónica de Ag pelos nanocompósitos.

No capítulo 3 pretendeu-se estudar a incorporação de NPs de Ag em quitosano tendo como objetivo a preparação de filmes transparentes com atividade antibacteriana. Foram estudados processos de funcionalização química do quitosano de modo a melhorar a distribuição das NPs no filme e a obter uma melhor eficiência bactericida. Diferentes métodos de síntese das NPs de Ag para avaliar o efeito do tamanho de partícula foram investigados, assim como o respetivo teor de Ag. Prepararam-se filmes de quitosano com outras NPs metálicas (nomeadamente de Au) para testar a influência de distintas nanofases metálicas na ação antimicrobiana, de modo a se tentar perceber os mecanismos de ação subjacentes às NPs metálicas.

No capítulo 4 foi estudada a preparação de filmes compósitos transparentes com atividade antimicrobiana, no entanto, neste caso o pululano foi utilizado como matriz. Foi investigada a incorporação de NPs de Ag com distinta distribuição de tamanhos de partícula e teores de Ag, avaliando-se a atividade antifúngica dos nanocompósitos preparados. O objetivo consistiu em verificar a influência destes parâmetros num tipo de atividade antimicrobiana pouco estudada,

principalmente quando se refere ao uso de materiais com base em biopolímeros e NPs metálicas. Um ensaio para estudar a aplicabilidade destes nanocompósitos com material de embalagem foi realizado de forma a avaliar o seu interesse prático.

No capítulo 5 estudou-se a incorporação de NPs de Cu em distintos substratos celulósicos. O objetivo deste capítulo foi averiguar de que modo a morfologia do *template* celulósico e a respetiva morfologia das nanoestruturas de Cu influenciam a extensão de oxidação deste tipo de NPs, propensas à oxidação sob condições ambiente. Foram estudados os diferentes materiais preparados, ao longo do tempo e recorrendo a várias técnicas instrumentais, de modo a tentar compreender os processos subjacentes a este efeito oxidativo. Foi também estudado o efeito antibacteriano dos materiais preparados, tendo com objetivo avaliar o efeito da variação de substrato celulósico em conjunto com a alteração da morfologia da nanofase de Cu.

## 1.7 Referências

- [1] Pinto RJB, Neves M, Pascoal Neto C, Trindade T. Composites of cellulose and metal nanoparticles. In: Ebrahimi F, editor. *Composites – New Trends and Developments*. Rijeka, Croatia: InTech; **2012**. p. 73-96.
- [2] Sanchez C, Soler-Illia G, Ribot F, Lalot T, Mayer CR, Cabuil V. Designed hybrid organic-inorganic nanocomposites from functional nanobuilding blocks. *Chem. Mater.* **2001** *13*, 3061-3083.
- [3] Sanchez C, Belleville P, Popall M, Nicole L. Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chem. Soc. Rev.* **2011** *40*, 696-753.
- [4] Sanchez C, Rozes L, Ribot F, Laberty-Robert C, Grosso D, Sassoie C, et al. "Chimie douce": A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials. *C. R. Chim.* **2010** *13*, 3-39.
- [5] Tao AR, Habas S, Yang P. Shape control of colloidal metal nanocrystals. *Small* **2008** *4*, 310-325.
- [6] Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, Schatz GC. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* **2003** *107*, 668-677.
- [7] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009** *145*, 83-96.
- [8] Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **2009** *27*, 76-83.
- [9] Cady NC, Behnke JL, Strickland AD. Copper-Based Nanostructured Coatings on Natural Cellulose: Nanocomposites Exhibiting Rapid and Efficient Inhibition of a Multi-Drug Resistant Wound Pathogen, *A. baumannii*, and Mammalian Cell Biocompatibility In Vitro. *Adv. Funct. Mater.* **2011** *21*, 2506-2514.
- [10] Manorama SV, Basak P, Singh S. Anti-Microbial Polymer Nanocomposites. In: Trindade T, Daniela-da-Silva AL, editors. *Nanocomposite Particles for Bio-Applications*. Singapura: Pan Stanford Publishing; **2011**. p. 249-264.
- [11] Belgacem MN, Gandini A. *Monomers Polymers and Composites from Renewable Resources*. Amsterdam: Elsevier; **2008**.
- [12] Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2005** *44*, 3358-3393.
- [13] Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.* **2000** *35*, 261-270.
- [14] Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **2006** *27*, 145-151.

- [15] Muzzarelli R, Muzzarelli C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. In: Heinze T, editor. Polysaccharides I: Springer Berlin / Heidelberg; **2005**. p. 151-209.
- [16] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006** *31*, 603-632.
- [17] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.* **2008** *73*, 515-531.
- [18] Pinto RJB, Marques PAAP, Martins MA, Neto CP, Trindade T. Electrostatic assembly and growth of gold nanoparticles in cellulosic fibres. *J. Colloid Interface Sci.* **2007** *312*, 506-512.
- [19] Marques PAAP, Nogueira HIS, Pinto RJB, Neto CP, Trindade T. Silver-bacterial cellulosic sponges as active SERS substrates. *J. Raman Spectrosc.* **2008** *39*, 439-443.
- [20] Goncalves G, Marques PAAP, Pinto RJB, Trindade T, Pascoal Neto C. Surface modification of cellulosic fibres for multi-purpose TiO<sub>2</sub> based nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **2009** *69*, 1051-1056.
- [21] Marques P, Trindade T, Neto CP. Titanium dioxide/cellulose nanocomposites prepared by a controlled hydrolysis method. *Compos. Sci. Technol.* **2006** *66*, 1038-1044.
- [22] Pinto RJB, Marques PAAP, Barros-Timmons AM, Trindade T, Neto CP. Novel SiO<sub>2</sub>/cellulose nanocomposites obtained by in situ synthesis and via polyelectrolytes assembly. *Compos. Sci. Technol.* **2008** *68*, 1088-1093.
- [23] Fernandes SCM, Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C, Gandini A. Novel materials based on chitosan and cellulose. *Polym. Int.* **2011** *60*, 875-882.
- [24] Fernandes SCM, Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C, Gandini A, Berglund LA, et al. Transparent chitosan films reinforced with a high content of nanofibrillated cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2010** *81*, 394-401.
- [25] Fernandes SCM, Oliveira L, Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C, Gandini A, et al. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chem.* **2009** *11*, 2023-2029.
- [26] Fernandes SCM, Freire CSR, Silvestre AJD, Desbrieres J, Gandini A, Neto CP. Production of Coated Papers with Improved Properties by Using a Water-Soluble Chitosan Derivative. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010** *49*, 6432-6438.
- [27] Trovatti E, Fernandes SCM, Rubatat L, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP. Sustainable nanocomposite films based on bacterial cellulose and pullulan. *Cellulose* **2012** *19*, 729-737.
- [28] Trovatti E, Fernandes SCM, Rubatat L, Perez DdS, Freire CSR, Silvestre AJD, et al. Pullulan-nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. *Compos. Sci. Technol.* **2012** *72*, 1556-1561.



- [29] Kickelbick G. Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale. *Prog. Polym. Sci.* **2003** 28, 83-114.
- [30] Hoffman DW, Roy R, Komarneni S. Diphasic xerogels, a new class of materials - Phases in the system  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ . *J. Am. Ceram. Soc.* **1984** 67, 468-471.
- [31] Komarneni S. Nanocomposites. *J. Mater. Chem.* **1992** 2, 1219-1230.
- [32] Kelly A. Composites in context. *Compos. Sci. Technol.* **1985** 23, 171-199.
- [33] Thostenson ET, Li CY, Chou TW. Nanocomposites in context. *Compos. Sci. Technol.* **2005** 65, 491-516.
- [34] Kelly A, Cahn RW. Concise encyclopedia of composite materials. In: Kelly A, Cahn RW, Bever MB, editors. 1<sup>st</sup> ed: Pergamon; **1994**.
- [35] Wolf BWJ, OH, US). Use of pullulan as a slowly digested carbohydrate. United States: Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, US); **2005**.
- [36] Hijiya HO, JA), Shiosaka, Makoto (Okayama, JA). Process for the preparation of food containing pullulan and amylose. United States: Hayashibara Biochemical Laboratories, Incorporated (Okayama, JA); **1975**.
- [37] Gross S, Camozzo D, Di Noto V, Armelao L, Tondello E. PMMA: A key macromolecular component for dielectric low-kappa hybrid inorganic-organic polymer films. *Eur. Polym. J.* **2007** 43, 673-696.
- [38] Sanchez C, Soler-Illia G, Ribot F, Grosso D. Design of functional nano-structured materials through the use of controlled hybrid organic-inorganic interfaces. *C. R. Chim.* **2003** 6, 1131-1151.
- [39] Esteves ACC, Barros-Timmons A, Trindade T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. *Quim. Nova* **2004** 27, 798-806.
- [40] Sanchez C, Ribot F, Lebeau B. Molecular design of hybrid organic-inorganic nanocomposites synthesized via sol-gel chemistry. *J. Mater. Chem.* **1999** 9, 35-44.
- [41] Nicole L, Rozes L, Sanchez C. Integrative Approaches to Hybrid Multifunctional Materials: From Multidisciplinary Research to Applied Technologies. *Adv. Mater.* **2010** 22, 3208-3214.
- [42] Mammeri F, Le Bourhis E, Rozes L, Sanchez C. Mechanical properties of hybrid organic-inorganic materials. *J. Mater. Chem.* **2005** 15, 3787-3811.
- [43] Balazs AC, Emrick T, Russell TP. Nanoparticle polymer composites: Where two small worlds meet. *Science* **2006** 314, 1107-1110.
- [44] Yang K-K, Wang X-L, Wang Y-Z. Progress in nanocomposite of biodegradable polymer. *J. Ind. Eng. Chem.* **2007** 13, 485-500.

- [45] Thomas V, Namdeo M, Mohan YM, Bajpai SK, Bajpai M. Review on polymer, hydrogel and microgel metal nanocomposites: A facile nanotechnological approach. *J. Macromol. Sci. Part A-Pure Appl. Chem.* **2008** 45, 107-119.
- [46] [http://apps.webofknowledge.com/UA\\_GeneralSearch\\_input.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&SID=T197f8BmdNNbBKBPHc9&preferencesSaved=](http://apps.webofknowledge.com/UA_GeneralSearch_input.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&SID=T197f8BmdNNbBKBPHc9&preferencesSaved=) (acedido em 10 de Setembro de 2012).
- [47] Aime C, Coradin T. Nanocomposites from biopolymer hydrogels: Blueprints for white biotechnology and green materials chemistry. *J. Polym. Sci. Pt. B-Polym. Phys.* **2012** 50, 669-680.
- [48] Darder M, Aranda P, Ruiz-Hitzky E. Bionanocomposites: A new concept of ecological, bioinspired, and functional hybrid materials. *Adv. Mater.* **2007** 19, 1309-1319.
- [49] Li X, Chang W-C, Chao YJ, Wang R, Chang M. Nanoscale Structural and Mechanical Characterization of a Natural Nanocomposite Material: The Shell of Red Abalone. *Nano Lett.* **2004** 4, 613-617.
- [50] Liu TB, Burger C, Chu B. Nanofabrication in polymer matrices. *Prog. Polym. Sci.* **2003** 28, 5-26.
- [51] Trindade T, O'Brien P, Pickett NL. Nanocrystalline semiconductors: Synthesis, properties, and perspectives. *Chem. Mater.* **2001** 13, 3843-3858.
- [52] Ghosh SK, Pal T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. *Chem. Rev.* **2007** 107, 4797-4862.
- [53] Cai J, Kimura S, Wada M, Kuga S. Nanoporous Cellulose as Metal Nanoparticles Support. *Biomacromolecules* **2009** 10, 87-94.
- [54] Esteves A. Síntese e caracterização de nanocompósitos funcionais de matriz polimérica. Aveiro: Universidade de Aveiro; 2007.
- [55] Neves MC, Neto CP, Trindade T. Eco-Friendly Hybrid Pigments Made of Cellulose and Iron Oxides. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012** 12, 6817-6821.
- [56] Pirkkalainen K, Leppanen K, Vainio U, Webb MA, Elbra T, Kohout T, et al. Nanocomposites of magnetic cobalt nanoparticles and cellulose. *Eur. Phys. J. D* **2008** 49, 333-342.
- [57] Diez I, Eronen P, Osterberg M, Linder MB, Ikkala O, Ras RHA. Functionalization of Nanofibrillated Cellulose with Silver Nanoclusters: Fluorescence and Antibacterial Activity. *Macromol. Biosci.* **2011** 11, 1185-1191.
- [58] Pinto RJB, Marques PAAP, Pascoal Neto C, Trindade T, Daina S, Sadocco P. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. *Acta Biomater.* **2009** 5, 2279-2289.
- [59] Ozin GA, Cademartiri L. From Ideas to Innovation: Nanochemistry as a Case Study. *Small* **2011** 7, 49-54.

- [60] Caseri W. Nanocomposites of polymers and metals or semiconductors: Historical background and optical properties. *Macromol. Rapid Commun.* **2000** 21, 705-722.
- [61] Faraday M. Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philos. Trans. R. Soc.* **1857** 147, 145-181.
- [62] Vanden Bout DA. Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications. New York: Marcel Dekker, Inc; **2002**.
- [63] Liz-Marzan LM. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir* **2006** 22, 32-41.
- [64] Perez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzan LM, Mulvaney P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005** 249, 1870-1901.
- [65] Aherne D, Ledwith DM, Gara M, Kelly JM. Optical properties and growth aspects of silver nanoprisms produced by a highly reproducible and rapid synthesis at room temperature. *Adv. Funct. Mater.* **2008** 18, 2005-2016.
- [66] Gou L, Chipara M, Zaleski JM. Convenient, rapid synthesis of Ag nanowires. *Chem. Mater.* **2007** 19, 1755-1760.
- [67] <http://nanocomposix.com/kb/general/color-engineering> (acedido em 4 de Outubro de 2012).
- [68] Mulvaney P, Liz-Marzan LM, Giersig M, Ung T. Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters. *J. Mater. Chem.* **2000** 10, 1259-1270.
- [69] Ung T, Liz-Marzan LM, Mulvaney P. Gold nanoparticle thin films. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **2002** 202, 119-126.
- [70] Dankovich TA, Gray DG. Bactericidal Paper Impregnated with Silver Nanoparticles for Point-of-Use Water Treatment. *Environ. Sci. Technol.* **2011** 45, 1992-1998.
- [71] Wu D, Fang Y. The adsorption behavior of p-hydroxybenzoic acid on a silver-coated filter paper by surface enhanced Raman scattering. *J. Colloid Interface Sci.* **2003** 265, 234-238.
- [72] Ma W, Fang Y. Experimental (SERS) and theoretical (DFT) studies on the adsorption of p-, m-, and o-nitroaniline on gold nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2006** 303, 1-8.
- [73] Ngo YH, Li D, Simon GP, Gamier G. Paper surfaces functionalized by nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011** 163, 23-38.
- [74] Jiang T, Liu L, Yao J. In situ Deposition of Silver Nanoparticles on the Cotton Fabrics. *Fiber. Polym.* **2011** 12, 620-625.
- [75] El-Shishtawy RM, Asiri AM, Abdelwahed NAM, Al-Otaibi MM. In situ production of silver nanoparticle on cotton fabric and its antimicrobial evaluation. *Cellulose* **2011** 18, 75-82.

- [76] Montazer M, Alimohammadi F, Shamei A, Rahimi MK. In situ synthesis of nano silver on cotton using Tollens' reagent. *Carbohydr. Polym.* **2012** 87, 1706-1712.
- [77] He JH, Kunitake T, Nakao A. Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chem. Mater.* **2003** 15, 4401-4406.
- [78] Johnston JH, Nilsson T. Nanogold and nanosilver composites with lignin-containing cellulose fibres. *J. Mater. Sci.* **2012** 47, 1103-1112.
- [79] Li Z, Friedrich A, Taubert A. Gold microcrystal synthesis via reduction of HAuCl<sub>4</sub> by cellulose in the ionic liquid 1-butyl-3-methyl imidazolium chloride. *J. Mater. Chem.* **2008** 18, 1008-1014.
- [80] Vainio U, Pirkkalainen K, Kisko K, Goerigk G, Kotelnikova NE, Serimaa R. Copper and copper oxide nanoparticles in a cellulose support studied using anomalous small-angle X-ray scattering. *European Physical Journal D* **2007** 42, 93-101.
- [81] Li Q, Yao G, Zeng X, Jing Z, Huo Z, Jin F. Facile and Green Production of Cu from CuO Using Cellulose under Hydrothermal Conditions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012** 51, 3129-3136.
- [82] Benaissi K, Johnson L, Walsh DA, Thielemans W. Synthesis of platinum nanoparticles using cellulosic reducing agents. *Green Chem.* **2010** 12, 220-222.
- [83] Johnson L, Thielemans W, Walsh DA. Synthesis of carbon-supported Pt nanoparticle electrocatalysts using nanocrystalline cellulose as reducing agent. *Green Chem.* **2011** 13, 1686-1693.
- [84] Tankhiwale R, Bajpai SK. Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2009** 69, 164-168.
- [85] Dong H, Hinestroza JP. Metal Nanoparticles on Natural Cellulose Fibers: Electrostatic Assembly and In Situ Synthesis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009** 1, 797-803.
- [86] Sharifi N, Tajabadi F, Taghavinia N. Nanostructured silver fibers: Facile synthesis based on natural cellulose and application to graphite composite electrode for oxygen reduction. *Int. J. Hydrogen Energy* **2010** 35, 3258-3262.
- [87] Ishida T, Watanabe H, Bebeko T, Akita T, Haruta M. Aerobic oxidation of glucose over gold nanoparticles deposited on cellulose. *Appl. Catal. A-Gen.* **2010** 377, 42-46.
- [88] Mary G, Bajpai SK, Chand N. Copper (II) Ions and Copper Nanoparticles-Loaded Chemically Modified Cotton Cellulose Fibers with Fair Antibacterial Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009** 113, 757-766.
- [89] Kotelnikova N, Vainio U, Pirkkainen K, Serimaa R. Novel approaches to metallization of cellulose by reduction of cellulose-incorporated copper and nickel ions. *Macromol. Symp.* **2007** 254, 74-79.

- [90] He JH, Kunitake T, Nakao A. Facile fabrication of composites of platinum nanoparticles and amorphous carbon films by catalyzed carbonization of cellulose fibers. *Chem. Commun.* **2004** 410-411.
- [91] Omrani AA, Taghavinia N. Photo-induced growth of silver nanoparticles using UV sensitivity of cellulose fibers. *Appl. Surf. Sci.* **2012** 258, 2373-2377.
- [92] Son WK, Youk JH, Park WH. Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2006** 65, 430-434.
- [93] Li SM, Jia N, Zhu JF, Ma MG, Xu F, Wang B, et al. Rapid microwave-assisted preparation and characterization of cellulose-silver nanocomposites. *Carbohydr. Polym.* **2011** 83, 422-429.
- [94] Li S-M, Jia N, Ma M-G, Zhang Z, Liu Q-H, Sun R-C. Cellulose-silver nanocomposites: Microwave-assisted synthesis, characterization, their thermal stability, and antimicrobial property. *Carbohydr. Polym.* **2011** 86, 441-447.
- [95] Silva AR, Unali G. Controlled silver delivery by silver-cellulose nanocomposites prepared by a one-pot green synthesis assisted by microwaves. *Nanotechnology* **2011** 22, 315605.
- [96] Boufi S, Ferraria AM, Botelho do Rego AM, Battaglini N, Herbst F, Vilar MR. Surface functionalisation of cellulose with noble metals nanoparticles through a selective nucleation. *Carbohydr. Polym.* **2011** 86, 1586-1594.
- [97] Yokota S, Kitaoka T, Opietnik M, Rosenau T, Wariishi H. Synthesis of Gold Nanoparticles for In Situ Conjugation with Structural Carbohydrates. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2008** 47, 9866-9869.
- [98] Gruber S, Taylor RNK, Scheel H, Greil P, Zollfrank C. Cellulose-biotemplated silica nanowires coated with a dense gold nanoparticle layer. *Mater. Chem. Phys.* **2011** 129, 19-22.
- [99] Yang G, Xie J, Deng Y, Bian Y, Hong F. Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose/AgNPs composite: A "green" route for antibacterial application. *Carbohydr. Polym.* **2012** 87, 2482-2487.
- [100] Yang G, Xie J, Hong F, Cao Z, Yang X. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2012** 87, 839-845.
- [101] Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2008** 72, 43-51.
- [102] de Santa Maria LC, Santos ALC, Oliveira PC, Barud HS, Messaddeq Y, Ribeiro SJL. Synthesis and characterization of silver nanoparticles impregnated into bacterial cellulose. *Mater. Lett.* **2009** 63, 797-799.
- [103] Barud HS, Barrios C, Regiani T, Marques RFC, Verelst M, Dexpert-Ghys J, et al. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* **2008** 28, 515-518.

- [104] Jung R, Kim Y, Kim HS, Jin HJ. Antimicrobial Properties of Hydrated Cellulose Membranes With Silver Nanoparticles. *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.* **2009** 20, 311-324.
- [105] Zhang T, Wang W, Zhang D, Zhang X, Ma Y, Zhou Y, et al. Biotemplated Synthesis of Gold Nanoparticle-Bacteria Cellulose Nanofiber Nanocomposites and Their Application in Biosensing. *Adv. Funct. Mater.* **2010** 20, 1152-1160.
- [106] Wang W, Zhang T-J, Zhang D-W, Li H-Y, Ma Y-R, Qi L-M, et al. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of heme proteins on gold nanoparticles-bacteria cellulose nanofibers nanocomposite. *Talanta* **2011** 84, 71-77.
- [107] Wang W, Li H-Y, Zhang D-W, Jiang J, Cui Y-R, Qiu S, et al. Fabrication of Biezymatic Glucose Biosensor Based on Novel Gold Nanoparticles-Bacteria Cellulose Nanofibers Nanocomposite. *Electroanalysis* **2010** 22, 2543-2550.
- [108] Pinto RJB, Neves MC, Pascoal Neto C, Trindade T. Growth and chemical stability of copper nanostructures on cellulosic fibers *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012** Submitted.
- [109] Yang J, Sun D, Li J, Yang X, Yu J, Hao Q, et al. In situ deposition of platinum nanoparticles on bacterial cellulose membranes and evaluation of PEM fuel cell performance. *Electrochim. Acta* **2009** 54, 6300-6305.
- [110] Olsson RT, Samir MASA, Salazar-Alvarez G, Belova L, Strom V, Berglund LA, et al. Making flexible magnetic aerogels and stiff magnetic nanopaper using cellulose nanofibrils as templates. *Nat. Nanotechnol.* **2010** 5, 584-588.
- [111] Ifuku S, Tsuji M, Morimoto M, Saimoto H, Yano H. Synthesis of Silver Nanoparticles Templated by TEMPO-Mediated Oxidized Bacterial Cellulose Nanofibers. *Biomacromolecules* **2009** 10, 2714-2717.
- [112] Martins NCT, Freire C, Pinto RJB, Fernandes S, Pascoal Neto C, Silvestre A, et al. Electrostatic assembly of silver nanoparticles onto nanofibrillated cellulose for the development of antibacterial paper products. *Cellulose* **2012** 19, 1425-1436.
- [113] Dallas P, Sharma VK, Zboril R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011** 166, 119-135.
- [114] Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **1982** 86, 3391-3395.
- [115] Creighton JA, Blatchford CG, Albrecht MG. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1979** 75, 790-798.
- [116] Sondi I, Goia DV, Matijevic E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2003** 260, 75-81.

- [117] Hubsch E, Ball V, Senger B, Decher G, Voegel JC, Schaaf P. Controlling the growth regime of polyelectrolyte multilayer films: Changing from exponential to linear growth by adjusting the composition of polyelectrolyte mixtures. *Langmuir* **2004** 20, 1980-1985.
- [118] Sun YG, Xia YN. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science* **2002** 298, 2176-2179.
- [119] Rivas L, Sanchez-Cortes S, García-Ramos JV, Morcillo G. Growth of Silver Colloidal Particles Obtained by Citrate Reduction To Increase the Raman Enhancement Factor. *Langmuir* **2001** 17, 574-577.
- [120] Paper Chemistry. Glasgow: Blackie; **1996**.
- [121] Ribitsch V, Stana-Kleinschek K, Jeler S. The influence of classical and enzymatic treatment on the surface charge of cellulose fibres. *Colloid Polym. Sci.* **1996** 274, 388-394.
- [122] Hyde K, Dong H, Hinstroza JP. Effect of surface cationization on the conformal deposition of polyelectrolytes over cotton fibers. *Cellulose* **2007** 14, 615-623.
- [123] Song J, Birbach NL, Hinstroza JP. Deposition of silver nanoparticles on cellulosic fibers via stabilization of carboxymethyl groups. *Cellulose* **2012** 19, 411-424.
- [124] Chou WL, Yu DG, Yang MC. The preparation and characterization of silver-loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. *Polym. Adv. Technol.* **2005** 16, 600-607.
- [125] Abdel-Halim ES, Al-Deyab SS. Utilization of hydroxypropyl cellulose for green and efficient synthesis of silver nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2011** 86, 1615-1622.
- [126] Nadagouda MN, Speth TF, Varma RS. Microwave-Assisted Green Synthesis of Silver Nanostructures. *Acc. Chem. Res.* **2011** 44, 469-478.
- [127] Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Phys. Chem. B* **2008** 112, 13608-13619.
- [128] Fernandez A, Picouet P, Lloret E. Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. *Int. J. Food Microbiol.* **2010** 142, 222-228.
- [129] Kim SS, Park JE, Lee J. Properties and Antimicrobial Efficacy of Cellulose Fiber Coated with Silver Nanoparticles and 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane (3-MPTMS). *J. Appl. Polym. Sci.* **2011** 119, 2261-2267.
- [130] Martins NCT, Freire CSR, Pinto RJB, Fernandes SCM, Neto CP, Silvestre AJD, et al. Electrostatic assembly of Ag nanoparticles onto nanofibrillated cellulose for antibacterial paper products. *Cellulose* **2012** 19, 1425-1436.

- [131] Niu Z, Fang Y. Surface-enhanced Raman scattering of single-walled carbon nanotubes on silver-coated and gold-coated filter paper. *J. Colloid Interface Sci.* **2006** 303, 224-228.
- [132] Cabalin LM, Laserna JJ. Fast spatially resolved surface-enhanced Raman spectrometry on a silver coated filter paper using charge-coupled device detection. *Anal. Chim. Acta* **1995** 310, 337-345.
- [133] Liu Z, Li M, Turyanska L, Makarovskiy O, Patane A, Wu W, et al. Self-Assembly of Electrically Conducting Biopolymer Thin Films by Cellulose Regeneration in Gold Nanoparticle Aqueous Dispersions. *Chem. Mater.* **2010** 22, 2675-2680.
- [134] Koga H, Tokunaga E, Hidaka M, Umemura Y, Saito T, Isogai A, et al. Topochemical synthesis and catalysis of metal nanoparticles exposed on crystalline cellulose nanofibers. *Chem. Commun.* **2010** 46, 8567-8569.
- [135] Pinto RJB, Almeida A, Fernandes SCM, Freire CSR, Silvestre AJD, Pascoal Neto C, et al. Antifungal activity of transparent nanocomposite thin films of pullulan and silver against *Aspergillus niger*. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2012** DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.1009.1045.
- [136] Tan X, Deng W, Liu M, Zhang Q, Wang Y. Carbon nanotube-supported gold nanoparticles as efficient catalysts for selective oxidation of cellobiose into gluconic acid in aqueous medium. *Chem. Commun.* **2009** 7179-7181.
- [137] Luckham RE, Brennan JD. Bioactive paper dipstick sensors for acetylcholinesterase inhibitors based on sol-gel/enzyme/gold nanoparticle composites. *Analyst* **2010** 135, 2028-2035.
- [138] Turyanska L, Makarovskiy O, Patane A, Kozlova NV, Liu Z, Li M, et al. High magnetic field quantum transport in Au nanoparticle-cellulose films. *Nanotechnology* **2012** 23, 045702.
- [139] Gamarra D, Munuera G, Hungria AB, Fernández-García M, Conesa JC, Midgley PA, et al. Structure–Activity Relationship in Nanostructured Copper–Ceria-Based Preferential CO Oxidation Catalysts. *J. Phys. Chem. C* **2007** 111, 11026-11038.
- [140] Guillot S, Chemelli A, Bhattacharyya S, Warmont F, Glatter O. Ordered Structures in Carboxymethylcellulose-Cationic Surfactants-Copper Ions Precipitated Phases: in Situ Formation of Copper Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2009** 113, 15-23.
- [141] Pinto RJB, Neves MC, Pascoal Neto C, Trindade T. Growth and chemical stability of copper nanostructures on cellulosic fibers. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012** DOI: 10.1002/ejic.201200605.
- [142] Gelesky MA, Scheeren CW, Foppa L, Pavan FA, Dias SLP, Dupont J. Metal Nanoparticle/Ionic Liquid/Cellulose: New Catalytically Active Membrane Materials for Hydrogenation Reactions. *Biomacromolecules* **2009** 10, 1888-1893.
- [143] Himeshima N, Amao Y. Photoinduced hydrogen production from cellulose derivative with chlorophyll-a and platinum nanoparticles system. *Energy Fuels* **2003** 17, 1641-1644.



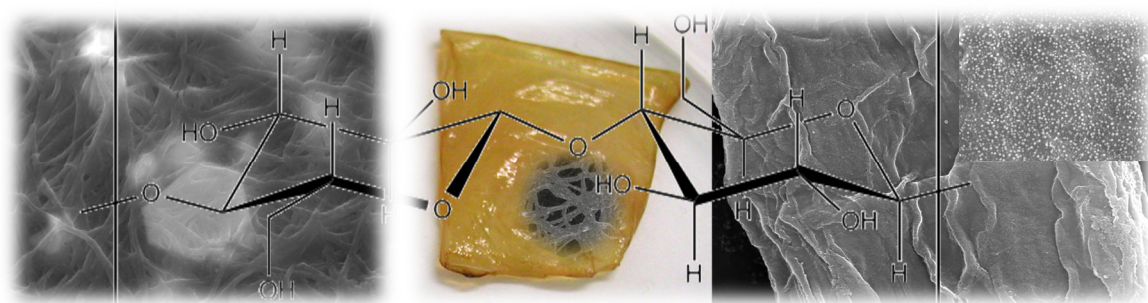
- 
- [144] Ferrando R, Jellinek J, Johnston RL. Nanoalloys: From theory to applications of alloy clusters and nanoparticles. *Chem. Rev.* **2008** 108, 845-910.
- [145] Yamada M, Tsuji T, Miyake M, Miyazawa T. Fabrication of a tubular FeCo bimetallic nanostructure using a cellulose-cobalt hexacyanoferrate composite as a precursor. *Chem. Commun.* **2009** 1538-1540.
- [146] Sun D, Yang J, Li J, Yu J, Xu X, Yang X. Novel Pd-Cu/bacterial cellulose nanofibers: Preparation and excellent performance in catalytic denitrification. *Appl. Surf. Sci.* **2010** 256, 2241-2244.
- [147] Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* **2008** 112, 5825-5834.
- [148] Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003** 27, 341-353.
- [149] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005** 16, 2346-2353.
- [150] Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000** 52, 662-668.
- [151] Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003** 69, 4278-4281.
- [152] Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanopart. Res.* **2010** 12, 1531-1551.
- [153] Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* **2007** 3, 95-101.
- [154] Smetana AB, Klabunde KJ, Marchin GR, Sorensen CM. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir* **2008** 24, 7457-7464.
- [155] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2004** 275, 177-182.
- [156] Gao F, Pang H, Xu SP, Lu QY. Copper-based nanostructures: promising antibacterial agents and photocatalysts. *Chem. Commun.* **2009** 3571-3573.
- [157] Lichter JA, Rubner MF. Polyelectrolyte Multilayers with Intrinsic Antimicrobial Functionality: The Importance of Mobile Polycations. *Langmuir* **2009** 25, 7686-7694.
- [158] Gupta A, Maynes M, Silver S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998** 64, 5042-5045.

- [159] Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *J. Proteome Res.* **2006** 5, 916-924.
- [160] Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Hase CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002** 46, 2668-2670.
- [161] Lichter JA, Van Vliet KJ, Rubner MF. Design of Antibacterial Surfaces and Interfaces: Polyelectrolyte Multilayers as a Multifunctional Platform. *Macromolecules* **2009** 42, 8573-8586.
- [162] Jadhav S, Gaikwad S, Nimse M, Rajbhoj A. Copper Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Antibacterial Activity. *J. Cluster Sci.* **2011** 22, 121-129.
- [163] Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B* **2006** 110, 16248-16253.
- [164] Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007** 73, 1712-1720.
- [165] Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006** 33, 627-634.
- [166] Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005** 71, 7589-7593.
- [167] [http://intra.vila.com.br/revista2003/rafael\\_e\\_goldinho/fungos.htm](http://intra.vila.com.br/revista2003/rafael_e_goldinho/fungos.htm) (acedido em 5 de Novembro de 2012).
- [168] <http://curlygirl.no.sapo.pt/fungi.htm> (acedido em 5 de Novembro de 2012).
- [169] [http://www.infopedia.pt/\\$reino-dos-fungos](http://www.infopedia.pt/$reino-dos-fungos) (acedido em 5 de Novembro de 2012).
- [170] [http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_pos2003/const\\_microorg/fungos.htm](http://www.eng.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/fungos.htm) (acedido em 5 Novembro de 2012).
- [171] Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2003** 28, 313-318.
- [172] Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006** 69, 485-492.
- [173] Miller JD. Fungi as contaminants in indoor air. *Atmos. Environ.* **1992** 26, 2163-2172.

- [174] Lee J, Kim K-J, Sung WS, Kim JG, Lee DG. The Silver Nanoparticle (Nano-Ag): a New Model for Antifungal Agents. In: Perez DP, editor. Silver Nanoparticles. Vukovar, Croatia: InTech; **2010**. p. 295-308.
- [175] Kim K-J, Sung WS, Moon S-K, Choi J-S, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008** 18, 1482-1484.
- [176] Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999** 12, 40-79.
- [177] Jo Y-K, Kim BH, Jung G. Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Dis.* **2009** 93, 1037-1043.
- [178] Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012** 54, 383-391.
- [179] Panacek A, Kolar M, Vecerova R, Prucek R, Soukupova J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **2009** 30, 6333-6340.
- [180] Jung WK, Kim SH, Koo HC, Shin S, Kim JM, Park YK, et al. Antifungal activity of the silver ion against contaminated fabric. *Mycoses* **2007** 50, 265-269.
- [181] Wright JB, Lam K, Hansen D, Burrell RE. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. *Am. J. Infect. Control* **1999** 27, 344-350.
- [182] Kim K-J, Sung WS, Suh BK, Moon S-K, Choi J-S, Kim JG, et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals* **2009** 22, 235-242.
- [183] Fadeel B, Garcia-Bennett AE. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2010** 62, 362-374.
- [184] AshaRani PV, Mun GLK, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009** 3, 279-290.



## Capítulo 2



### ***NANOCOMPÓSITOS DE PRATA DE MATRIZ CELULÓSICA (CB E CV)***

Neste capítulo descreve-se a preparação e as propriedades de nanocompósitos de celulose/Ag. Os nanocompósitos foram obtidos por diferentes metodologias, nomeadamente a síntese de Ag *in situ* e a deposição camada a camada (LbL) de NPs de Ag previamente preparadas, sendo usados dois substratos celulósicos distintos (CB e CV). Os nanocompósitos foram caracterizados em termos da sua morfologia, composição química e da sua atividade antibacteriana designadamente contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

## **CAPÍTULO 2 – NANOCOMPÓSITOS DE PRATA DE MATRIZ CELULÓSICA (CB E CV)**

2.1 Introdução.....	55
2.2 Preparação e caracterização de nanocompósitos celulose/Ag .....	57
2.2.1 Preparação de nanocompósitos através da metodologia <i>in situ</i> .....	58
2.2.2 Preparação de nanocompósitos através da metodologia LbL e difusão .....	65
2.3 Estudos da atividade antibacteriana dos nanocompósitos .....	68
2.4 Estudos de liberação catiónica de Ag pelos nanocompósitos.....	73
2.3. Conclusões.....	77
2.4. Referências .....	78

## 2.1 Introdução

Nos últimos anos tem-se assistido a um interesse renovado na utilização da celulose em novas aplicações, principalmente devido à crescente preocupação com a sustentabilidade e como tal ao interesse tecnológico em utilizar matérias-primas de fontes renováveis [1]. De entre os polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, a celulose é o polímero mais abundante na Natureza assim como o componente mais importante da parede celular das plantas. Este biopolímero é a base estrutural das paredes celulares de praticamente todas as plantas, alguns fungos (oomicetos) e de algumas algas, sendo por isso normalmente considerado uma matéria-prima quase inesgotável [2, 3].

A celulose é o constituinte maioritário da madeira de resinosas e folhosas, representando cerca de 40 a 45% da matéria seca da madeira. O principal método para obtenção deste biopolímero, que é utilizado principalmente para a produção de papel, é o processamento da madeira para obtenção da pasta de papel. A estrutura molecular específica e a sua tendência para formar ligações por pontes de hidrogénio concedem-lhe características de alta funcionalidade, compatibilidade e possibilidade de modificação química [2, 4].

Devido às suas características, a celulose e os seus derivados têm vindo a ser usados numa vasta gama de aplicações em diversas áreas para além da indústria do papel, tais como a indústria têxtil, no campo biomédico com materiais para engenharia de tecidos (propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos humanos, permitindo o fabrico simples de uma variedade de formas com porosidades moduláveis), na indústria alimentar, na eletrónica, entre outras [1, 2, 5, 6].

Além do principal método de produção, a extração a partir de plantas, existem outras formas para obtenção da celulose sendo uma delas a biossíntese através de diferentes tipos de microrganismos (algas, bactérias ou fungos). Entre todas as espécies produtoras de celulose bacteriana (CB) as bactérias do género *Acetobacter* são normalmente as mais usadas na sua produção pois têm a capacidade de produzir extracelularmente grandes quantidades de celulose de forma organizada [2, 7].

A CB é produzida na forma de uma membrana (meio de cultura estático) com aproximadamente 98,5% de água. A CB é caracterizada por apresentar uma estrutura tridimensional única de nano e microfibrilas que faz com que apresente propriedades substancialmente distintas da CV, embora a sua estrutura química seja idêntica. O seu elevado grau de pureza (não contém lenhina, hemicelulose, pectina e outros compostos associados, como na CV), elevada cristalinidade (60-90%), grande elasticidade, força mecânica (particularmente quando húmida) e capacidade de retenção de água faz com que este biopolímero seja amplamente usado em diferentes áreas [7-9]. Algumas das suas aplicações mais conhecidas são na indústria alimentar

e na área médica nomeadamente em curativos, pele artificial e biomembranas, no entanto também é usada, em menor extensão, no fabrico de papéis com maior resistência [2, 7, 8, 10].

A prata, tanto na forma metálica como iónica, apresenta uma citotoxicidade forte para uma ampla gama de microrganismos e o seu uso como agente antimicrobiano é bem conhecido [11, 12]. Na literatura encontra-se referido que o modo de ação antibacteriana das NPs de Ag é bastante semelhante ao ião prata, no entanto, a concentração mínima efetiva de biocida no caso das NPs de Ag encontra-se na gama nanomolar enquanto para os iões prata na gama micromolar [13].

A prata tem uma ação oligodinâmica, isto é, em concentrações baixas afeta a atividade de organismos vivos podendo, dependendo da concentração, estimular, inibir, ou mesmo destruir o organismo. A prata apresenta assim a capacidade de inibição do crescimento de bactérias (efeito bacteriostático) e/ou destruição das bactérias (efeito bactericida) [14, 15].

Como exemplificado no capítulo 1, a celulose encontra-se entre os biopolímeros mais estudados no que se refere à sua utilização para a preparação de bionanocompósitos com NPs metálicas, principalmente com NPs de Ag. Neste contexto, a associação de NPs de Ag a biopolímeros como a CV ou a CB representa uma abordagem estimulante para o desenvolvimento de novos materiais compósitos com uma elevada diversidade de aplicações nomeadamente em materiais onde as propriedades antibacterianas são cruciais.

Atendendo à diversidade de técnicas existentes para a preparação destes nanocompósitos (redução do Ag (I) *in situ* com diversos agentes redutores [16], a pós-deposição das NPs previamente preparadas [17]), este trabalho procurou fazer uma análise comparativa entre estas diversas metodologias. Para além disso foram avaliados diversos métodos para a preparação de materiais com base na CB, um substrato bastante menos estudado nesta área. Este estudo pretendeu investigar a influência de diversos parâmetros como as metodologias de síntese, tipo de substrato celulósico e teores de Ag na atividade antibacteriana apresentada pelos nanocompósitos sintetizados.

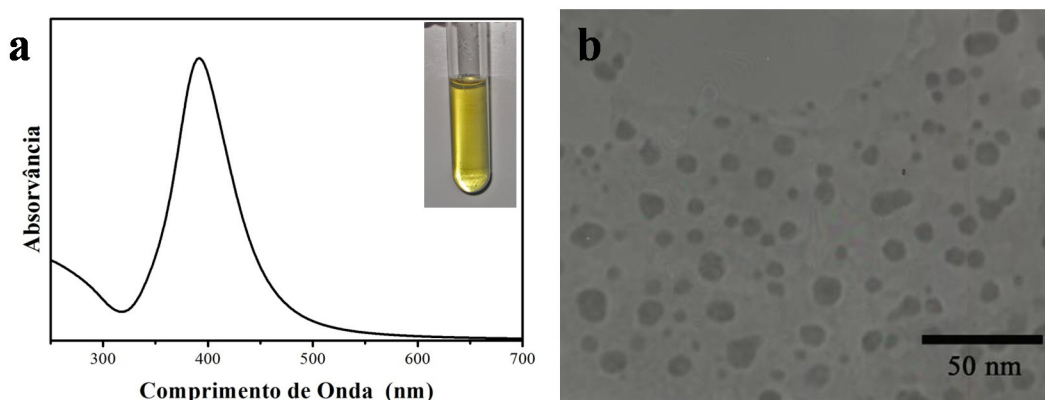
Este capítulo encontra-se dividido em três partes. Na primeira será abordada a preparação e caracterização de diversos nanocompósitos de celulose/Ag obtidos através de distintas metodologias de onde se destacam as metodologias *in situ* e de pós-deposição. Serão comparadas as diferenças nas propriedades óticas e morfológicas obtidas em função da metodologia e do substrato celulósico usado. Na segunda parte será apresentado o estudo da atividade antibacteriana dos nanocompósitos anteriormente preparados. Fatores como teor de prata, substrato e metodologia usada na síntese dos nanocompósitos, entre outros serão discutidos em pormenor. Por último será feito o estudo de libertação de Ag(I) pelos nanocompósitos de modo a avaliar a permanência da atividade antibacteriana ao longo do tempo.



## 2.2 Preparação e caracterização de nanocompósitos celulose/Ag

Neste trabalho foram preparados vários nanocompósitos por incorporação de NPs de Ag em substratos celulósicos, nomeadamente CB e CV. Uma vez que a morfologia e tamanho das NPs dependem consideravelmente do método utilizado na sua preparação, neste trabalho, para a síntese dos nanocompósitos foi usado o método de Creighton, o qual é baseado na redução de sais de Ag(I) com borohidreto de sódio [18], e o método de redução de  $\text{Ag}^+$  sob radiação UV.

Na preparação prévia das NPs de Ag, através do método de Creighton foram obtidas soluções coloidais amarelas que apresentaram uma banda de absorção com um máximo centrado a 392 nm (Figura 2.1a). Esta metodologia origina NPs esféricas tendo sido o seu tamanho estimado por análise de TEM e DLS. Através da análise de TEM (Figura 2.1b) obteve-se um tamanho médio de NPs de  $7,2 \pm 2,2$  nm. Através da análise de DLS o tamanho médio das NPs de Ag obtido foi de  $7,3 \text{ nm} \pm 1,1$  nm, confirmando assim o valor obtido por TEM. Esta pequena diferença poderá deve-se a que na análise de DLS é medido o diâmetro hidrodinâmico, que inclui a camada de hidratação.



**Figura 2.1** – Espectro de UV-vis e correspondente fotografia digital (a) e imagem de TEM (b) de coloides de Ag obtidos por redução com borohidreto de sódio.

A variação da quantidade de prata nos nanocompósitos foi efetuada alterando a concentração inicial do sal de Ag(I) nas metodologias *in situ* e variando a concentração de NPs de Ag no coloide inicial no caso da pós-deposição e difusão. A Tabela 2.1 descreve todas as amostras preparadas assim como o seu conteúdo final em Ag determinado por análise elementar (ICP).

**Tabela 2.1** – Nanocompósitos celulose/prata obtidos através de diferentes metodologias e teor final em prata determinado por análise elementar.

Substrato	Método	Referência	Ag (% m/m)
Celulose Vegetal (CV)	Redução do Ag <sup>+</sup> com borohidreto	CV/Ag <sub>bor1</sub>	$8,5 \times 10^{-2}$
		CV/Ag <sub>bor2</sub>	$4,5 \times 10^{-3}$
		CV/Ag <sub>bor3</sub>	$6,2 \times 10^{-4}$
		CV/Ag <sub>bor4</sub>	$1,6 \times 10^{-2}$
	Pós-deposição das NPs de Ag por LbL	CV//Ag <sub>1</sub>	0,57
		CV//Ag <sub>2</sub>	$3,3 \times 10^{-3}$
		CV//Ag <sub>3</sub>	$1,8 \times 10^{-3}$
		CV//Ag <sub>4</sub>	$1,2 \times 10^{-3}$
		CV//Ag <sub>5</sub>	$5,0 \times 10^{-3}$
		CV//Ag <sub>6</sub>	$5,0 \times 10^{-4}$
		CV//Ag <sub>7</sub>	$2,4 \times 10^{-2}$
	Redução do Ag <sup>+</sup> sob radiação UV	CV/Ag <sub>UV1</sub>	$8,5 \times 10^{-3}$
		CV/Ag <sub>UV2</sub>	$6,6 \times 10^{-4}$
Celulose Bacteriana (CB)	Redução do Ag <sup>+</sup> com borohidreto	CB/Ag <sub>bor1</sub>	4,4
		CB/Ag <sub>bor2</sub>	$7,4 \times 10^{-3}$
		CB/Ag <sub>bor3</sub>	$2,3 \times 10^{-1}$
	Difusão das NPs de Ag	CB/Ag <sub>dif1</sub>	$4,7 \times 10^{-3}$
		CB/Ag <sub>dif2</sub>	$1,3 \times 10^{-1}$
	Redução do Ag <sup>+</sup> sob radiação UV	CB/Ag <sub>UV1</sub>	$2,0 \times 10^{-2}$
		CB/Ag <sub>UV2</sub>	$2,9 \times 10^{-1}$
		CB/Ag <sub>UV3</sub>	$9,3 \times 10^{-2}$
		CB/Ag <sub>UV4</sub>	$6,1 \times 10^{-2}$

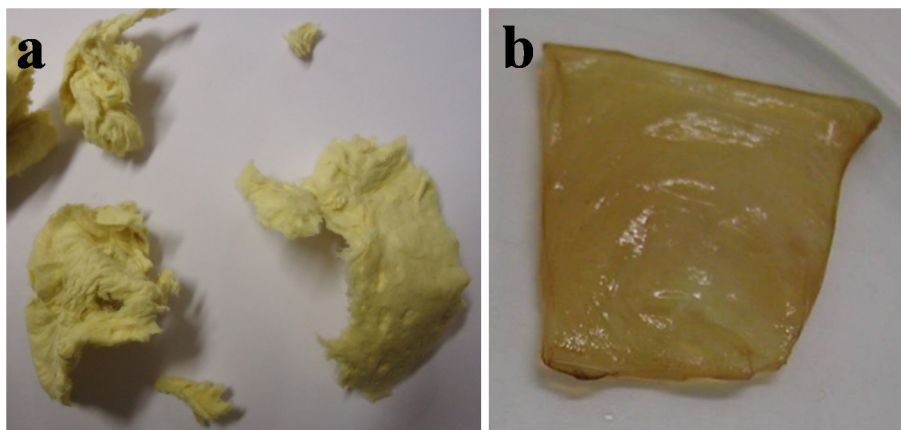
### 2.2.1 Preparação de nanocompósitos através da metodologia *in situ*

Devido ao seu carácter hidrofílico, as fibras de celulose quando dispersas em água têm a capacidade de “promover” a nucleação heterogênea de NPs de Ag na sua superfície. A CB, devido à sua estrutura 3D e altamente porosa, pode também atuar como uma membrana que permite a difusão das NPs de Ag para o seu interior [19, 20].

Para a preparação dos nanocompósitos através da metodologia *in situ* foram usadas duas estratégias distintas, nomeadamente a redução de Ag(I) com borohidreto e sob radiação UV.

Os nanocompósitos obtidos através destas estratégias apresentaram a coloração amarela característica dos coloides de Ag sintetizados pelo método do borohidreto (Figura 2.2). Tal como

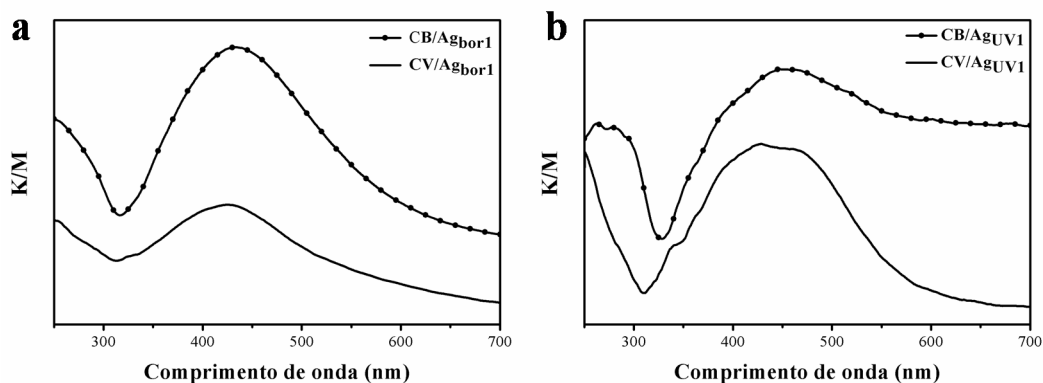
esperado, os nanocompósitos obtidos com maior quantidade de Ag(I) apresentaram uma coloração mais intensa do que no caso em que se usou menor quantidade do sal de Ag(I).



**Figura 2.2** – Fotografias digitais dos nanocompósitos de CV/Ag (a) e CB/Ag (b).

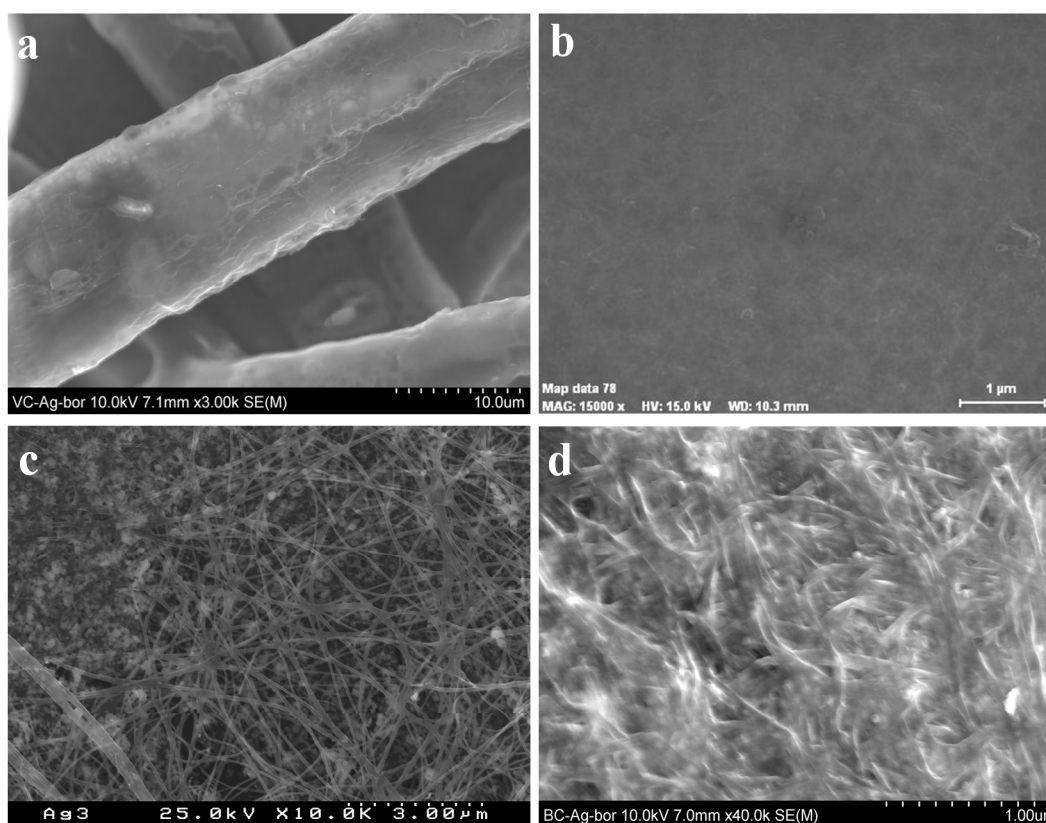
Os espectros óticos dos nanocompósitos obtidos através da redução do Ag(I) com borohidreto (Figura 2.3a) confirmaram a presença de NPs de Ag uma vez que, tanto para a CV como para a CB, se observou a banda de absorção típica das NPs de Ag no visível ( $\lambda_{\text{máx}} = 425$  nm para o CV/Ag<sub>bor1</sub> e  $\lambda_{\text{máx}} = 433$  nm para o CB/Ag<sub>bor1</sub>). Os espectros óticos dos nanocompósitos obtidos através da redução de Ag(I) sob radiação UV são apresentados na Figura 2.3b. No caso do nanocompósito CV/Ag<sub>UV1</sub> este apresenta uma banda com um máximo de absorção a 429 nm, isto é, a um comprimento de onda idêntico ao observado para o nanocompósito preparado com fibras de CV e usando o borohidreto com agente redutor. O nanocompósito CB/Ag<sub>UV1</sub> apresenta uma banda larga com um máximo de absorção a 447 nm. No caso dos nanocompósitos preparados por redução do Ag(I) sob radiação UV, a banda de absorção prolonga-se para maiores comprimentos de onda, o que poderá dever-se à formação de aglomerados e/ou diversidade de morfologias das NPs de Ag [21, 22]. Alguns trabalhos [23] referem que este comportamento se poderá dever a uma maior concentração de NPs metálicas (menor distância entre as NPs) no nanocompósito. No entanto neste trabalho, de acordo com as quantidades relativas de Ag nos nanocompósitos, não se verificou este comportamento.

Geralmente as bandas de absorção devidas ao plasmão de superfície das NPs de Ag nos nanocompósitos são mais largas em relação aos coloides originais, assim como ocorreu o deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda superiores. Esta observação pode dever-se a alterações na função dielétrica, do meio circundante (quando passamos da água para os biopolímeros) e/ou também ao acoplamento plasmónico devido às NPs se encontrarem mais próximas entre si na matriz celulósica [24, 25].



**Figura 2.3** – Espectros óticos de nanocompósitos de celulose/Ag obtidos por redução de Ag(I) com borohidreto (a) e sob radiação UV (b).

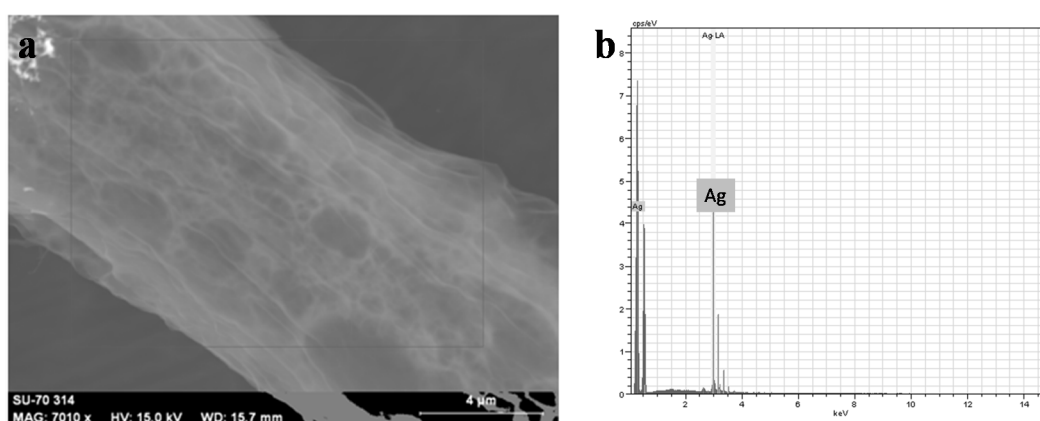
De modo a caracterizar a superfície e textura das amostras compósitas, estas foram analisadas por SEM. A Figura 2.4 mostra as imagens de SEM dos nanocompósitos obtidos por redução do Ag(I) com borohidreto para a CV e para a BC.



**Figura 2.4** – Imagens de SEM do nanocompósito CV/Ag<sub>borI</sub> (a e b) e do nanocompósitos CB/Ag<sub>borI</sub> (c e d) a diferentes ampliações.

No caso dos nanocompósitos com a CB a presença de Ag é inequívoca devido à observação direta das NPs na superfície dos nanocompósitos, no entanto para a CV não foi possível observar claramente NPs de Ag individualizadas à sua superfície, mesmo a ampliações elevadas. Neste caso específico as imagens de SEM da superfície dos nanocompósitos com CV parecem indicar a formação de um filme de Ag através da sobreposição das NPs que praticamente cobre toda a superfície das fibras de celulose. Para corroborar esta ideia procedeu-se à análise de EDX e ao mapeamento por EDX do nanocompósito CV/Ag<sub>borl</sub> (Figura 2.5 e Figura 2.6).

Como se pode observar na Figura 2.5, devido à natureza do substrato, a análise por SEM e EDX para este tipo de amostras é bastante complicada uma vez que o feixe degrada a própria amostra dificultando a obtenção de resultados exatos. Apesar deste facto o mapeamento do nanocompósito permitiu identificar a presença de Ag nas fibras.

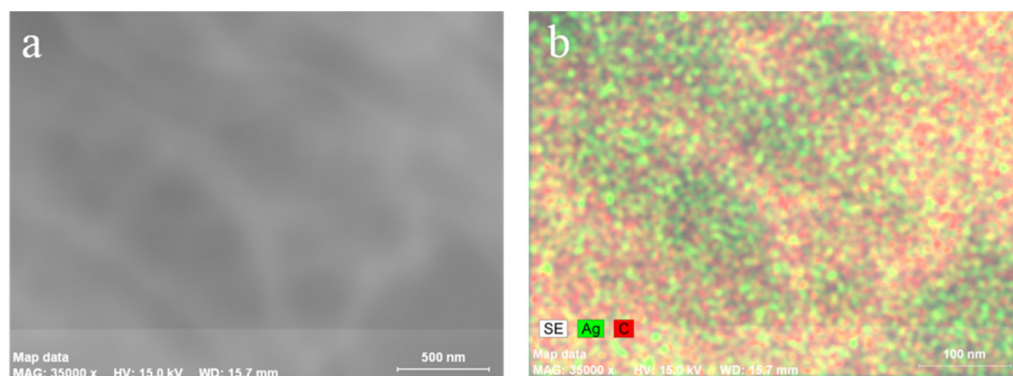


**Figura 2.5** – Imagem de SEM do nanocompósito CV/Ag<sub>borl</sub> (a) e respetivo espectro de EDX (b).

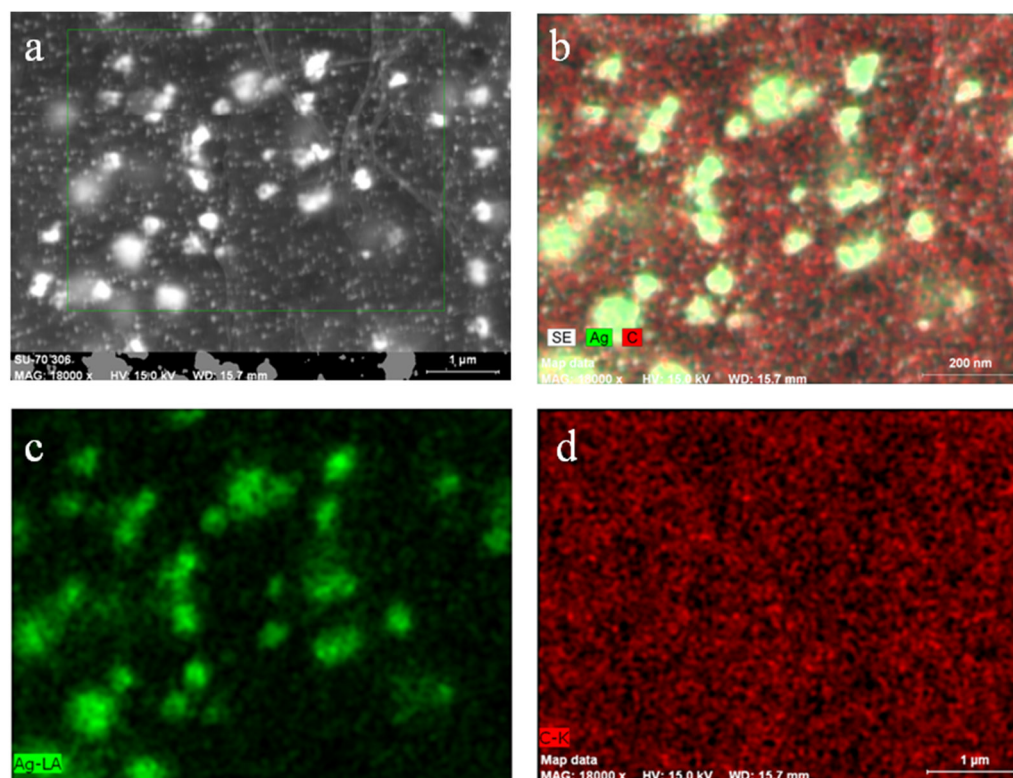
A imagem do mapeamento (Figura 2.6) mostra a presença de Ag, no entanto de igual modo ao verificado na Figura 2.5, observa-se que quando se procede a este tipo de análise a matriz orgânica do nanocompósito (neste caso a CV) degrada.

Para os nanocompósito CB/Ag<sub>borl</sub> também foi realizada a análise por EDX e respetivo mapeamento de modo a verificar a homogeneidade química das amostras e a observar a distribuição espacial de prata e carbono nos nanocompósitos. A Figura 2.7 mostra a imagem de SEM e o correspondente mapeamento por EDX para os elementos Ag e C típica para este tipo de nanocompósitos. Estes resultados mostram que quando a CB é usada como substrato ocorre uma distribuição homogénea de NPs de Ag discretas ao longo do nanocompósito com um tamanho médio de cerca de 38 nm, tanto na superfície como na estrutura interna das fibrilas, verificando-se em alguns casos a aglomeração das NPs de Ag em algumas zonas da CB.





**Figura 2.6** – Imagem de SEM do nanocompósito CV/Ag<sub>borl</sub> (a) e correspondente mapa de distribuição de elementos de Ag:C (b) (ampliação 35 kx).

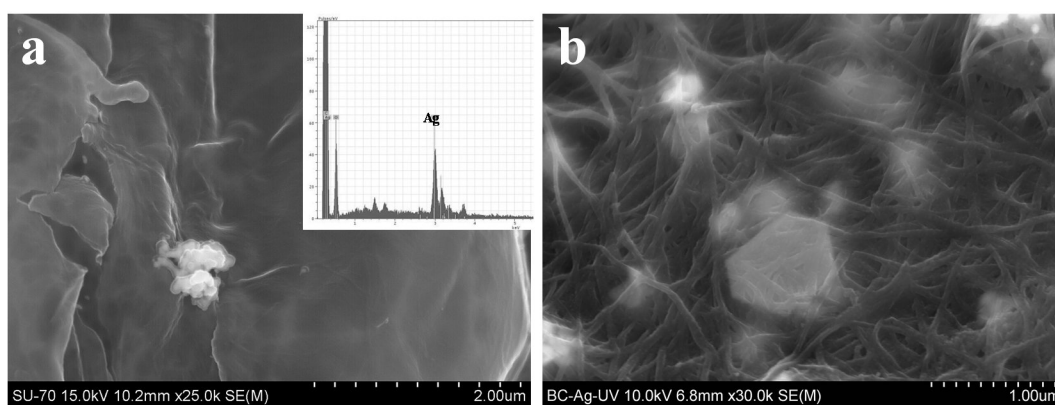


**Figura 2.7** – Imagem de SEM do nanocompósito CB/Ag<sub>borl</sub> (a) e correspondente mapa de distribuição de elementos de Ag:C (b), Ag (c) e C (d) (ampliação 18 kx).

Através da observação das imagens de SEM verificaram-se diferenças entre os nanocompósitos preparados por redução do Ag(I) por radiação UV (Figura 2.8) relativamente aos obtidos por redução por borohidreto. Foi possível observar a deposição preferencial das NPs à superfície das fibras e a formação de numerosos agregados de Ag metálica em ambos os substratos celulósicos estudados, sendo mais visíveis no caso da utilização da CB como matriz. Este resultado encontra-se de acordo com o descrito na literatura [26, 27] onde se verifica que a concentração do

sal de prata na solução não é um fator essencial neste tipo de síntese. Nestes trabalhos em nanocompósitos celulose/Ag [26] e fibras de acetato de celulose com Ag [27], ambos preparados por redução do  $\text{AgNO}_3$  sob radiação UV, a intensidade da radiação UV e o tempo de irradiação foram os fatores que afetaram mais a quantidade e a dispersão (aglomeração) das NPs.

A síntese dos nanocompósitos por esta metodologia mostrou que ocorre a formação de um filme contínuo de prata no caso das fibras do nanocompósito CV/Ag<sub>UV1</sub> e de NPs de Ag discretas no nanocompósito BC/Ag<sub>UV1</sub>. Neste último caso, além de NPs esféricas mais aglomeradas, obtiveram-se partículas com morfologias distintas, nomeadamente com formas triangulares e hexagonais, com tamanhos superiores às obtidas pelo método anterior. No caso destes nanocompósitos a distribuição de Ag nos materiais é heterogênea havendo áreas com elevado número de aglomerados e áreas sem aglomerados.



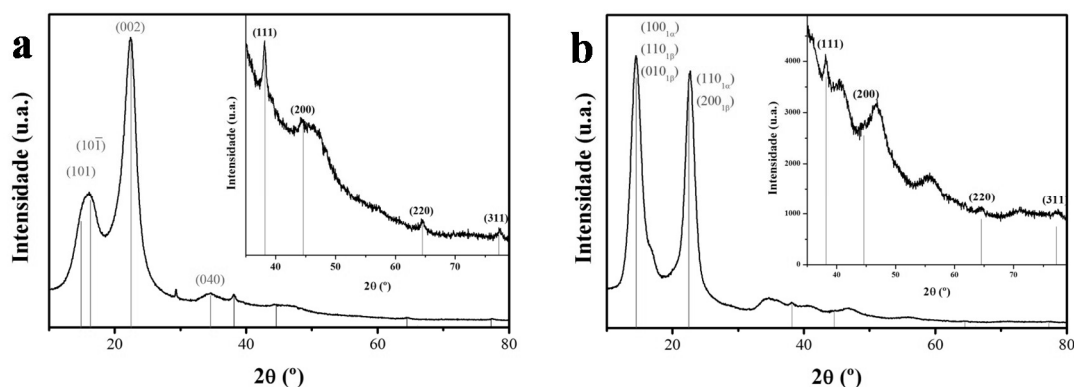
**Figura 2.8** – Imagens de SEM do nanocompósito CV/Ag<sub>UV1</sub> (inserção: espectro característico de EDX mostrando a presença de Ag) (a) e nanocompósito de BC/Ag<sub>UV1</sub> mostrando as diferentes morfologias (b).

Estas observações através de SEM confirmaram os resultados da caracterização ótica destes nanocompósitos, ou seja, devido à formação de NPs de Ag com morfologia distinta e mais aglomeradas, ocorre um alargamento da banda de absorção para maiores comprimentos de onda.

De modo a confirmar o papel ativo dos terminais redutores da celulose na formação das NPs de Ag, as fibras de celulose (CV e CB) foram tratadas com borohidreto de sódio, segundo uma metodologia conhecida [28], de modo a remover esses terminais. Após este tratamento, ambos os substratos foram imersos na solução do sal de Ag(I) e tentadas ambas as metodologias *in situ*, usando as mesmas condições descritas para os substratos sem tratamento. Neste caso não se verificou a formação de NPs de Ag, confirmando-se assim a ação redutora destes grupos na formação de Ag nos nanocompósitos. É de salientar que nos últimos anos vários trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos [16, 29, 30] onde é descrita a extrema importância destes grupos para a preparação de nanocompósitos à base de celulose. Estes estudos referem que podem ocorrer

interações eletrostáticas entre os íons prata e os grupos redutores da matriz da CB. Assim, as fibras que são carregadas negativamente podem atrair os íons prata via interações eletrostáticas sendo estes íons mantidos fixos e distribuídos uniformemente na superfície das fibras de celulose. Caso as fibras com os íons prata sejam depois imersos numa solução com um agente redutor, na presença ou ausência de agentes protetores, os íons prata serão reduzidos a partículas de  $\text{Ag}^0$  [29]. No caso da remoção destes grupos, a ligação da prata às matrizes celulósicas não ocorre.

A difração de raios X (XRD) foi usada na maioria das amostras de modo a identificar a estrutura das fases cristalinas presentes nos compósitos finais. A Figura 2.9 mostra os difratogramas dos nanocompósitos CV/ $\text{Ag}_{\text{bor1}}$  e CB/ $\text{Ag}_{\text{UV1}}$ . Verificou-se que, em ambos os casos, está presente uma fase identificada como Ag metálica sendo visível nos difratogramas as difrações  $2\theta$  correspondentes a esta fase:  $2\theta = 38,2^\circ$  (111),  $44,6^\circ$  (200),  $64,5^\circ$  (220) e  $77,3^\circ$  (311), o que está de acordo com o descrito na literatura para a estrutura cúbica de faces centradas [31].



**Figura 2.9** – Difratogramas de raios X dos nanocompósitos CV/ $\text{Ag}_{\text{bor1}}$  (a) e CB/ $\text{Ag}_{\text{UV1}}$  (b).

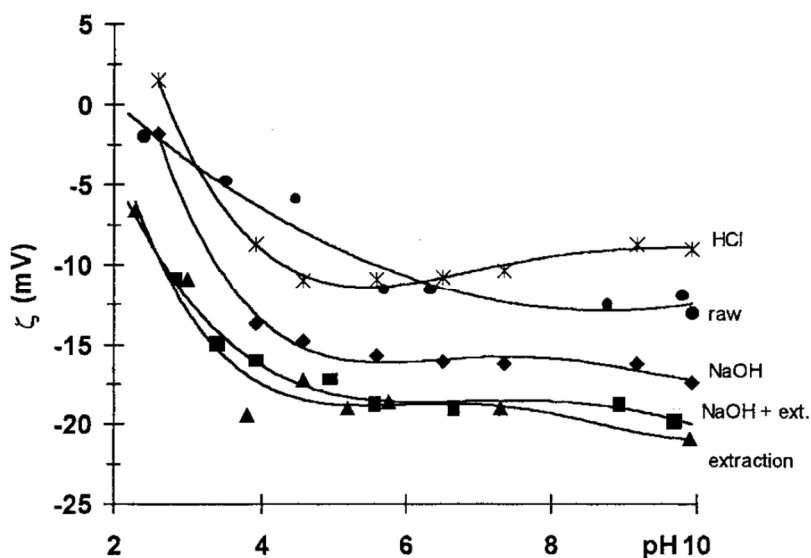
Para além da fase correspondente à Ag metálica é possível observar na Figura 2.9a os picos de difração da celulose I a  $2\theta = 14,9; 16,3; 22,5$  e  $34,6^\circ$  atribuídos aos planos (101), (10 $\bar{1}$ ), (002) e (040) [32]. No caso da CB (Figura 2.9b) verificou-se que esta apresenta picos a  $2\theta = 15$  e  $22,5^\circ$  que são devidos às fases  $I_\alpha$  e  $I_\beta$  presentes na matriz [33]. Neste caso, o pico a  $15^\circ$  é atribuído aos planos (100) $_{I\alpha}$ , (110) $_{I\beta}$  e (010) $_{I\beta}$  enquanto o pico a  $22,5^\circ$  é atribuído aos planos (110) $_{I\alpha}$  e (200) $_{I\beta}$ . No caso do nanocompósito com CB é possível observar outros picos de menor intensidade que se poderão dever a resíduos dos sais usados na sua produção.



### 2.2.2 Preparação de nanocompósitos através da metodologia LbL e difusão

Para a preparação dos nanocompósitos através destas duas estratégias procedeu-se à síntese prévia das NPs de Ag por redução com borohidreto e posterior ligação às fibras. No caso das fibras de CV foi usado o método de deposição camada a camada (LbL) enquanto para as fibras de CB foi usada a metodologia de difusão.

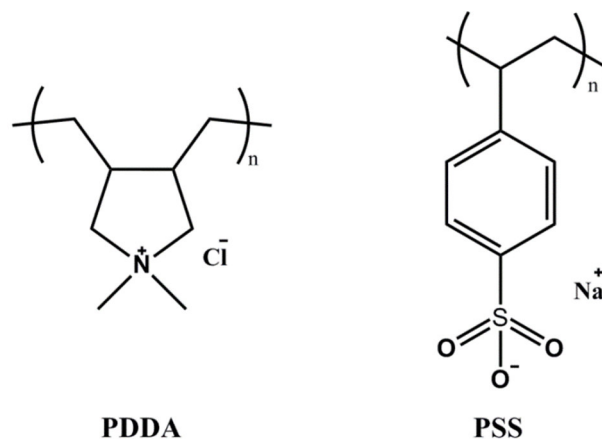
Normalmente as fibras de CV em meio aquoso apresentam carga superficial negativa numa ampla gama de pH devido à presença de unidades ionizáveis tais como grupos hidroxilo e carboxílicos resultantes do processamento químico, ou então devido à presença de outros polissacarídeos existentes em menor quantidade como as glucuronoxilanas. De facto, o potencial Zeta da celulose pura aproxima-se de zero apenas quando o pH é menor que 2,7 (Figura 2.10) [3].



**Figura 2.10** – Potencial Zeta de fibras de celulose em função do pH e da metodologia de extração [34].

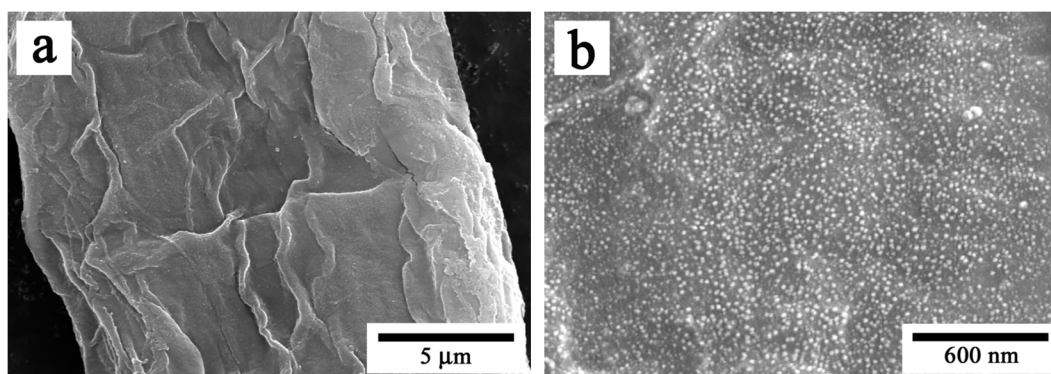
Através da análise do potencial Zeta das NPs de Ag sintetizadas verificou-se que estas apresentam igualmente carga negativa ( $-19,5 \pm 8,6$  mV a pH = 7). Uma vez que ambas as superfícies têm carga superficial negativa, torna-se inviável a deposição direta das NPs de Ag sobre a celulose, o que foi confirmado experimentalmente. No entanto, a adsorção sucessiva de um polieletrólito catiónico (PDDA), um polieletrólito aniónico (PSS) (Figura 2.11) e novamente o polieletrólito catiónico nas fibras de CV (potencial Zeta das fibras com as camadas PDDA/PSS/PDDA é de  $+12,0 \pm 4,3$  mV a pH = 6,6), antes da imersão no coloide de Ag, revelou-se uma metodologia promissora para a preparação de nanocompósitos como demonstrado anteriormente no caso de coloides de Au [20]. É de salientar que a técnica de LbL é aplicada normalmente a substratos homogêneos e regulares (por exemplo substratos de vidro) no entanto,

neste caso particular, as fibras de celulose são substratos com uma superfície mais irregular procedendo-se por isso à deposição sucessiva e sequencial dos polieletrólitos de modo a melhorar a homogeneidade das NPs no nanocompósito final.



**Figura 2.11** – Estrutura química dos dois polieletrólitos utilizados: PDDA – poli(cloreto de dialildimetilamónio) e PSS – poli(4-estirenosulfonato de sódio).

Através da análise de SEM dos nanocompósitos com CV verificou-se que ocorre uma distribuição homogênea da NPs de Ag na superfície desta matriz como exemplificado na Figura 2.12 para a amostra CV//Ag<sub>1</sub>.

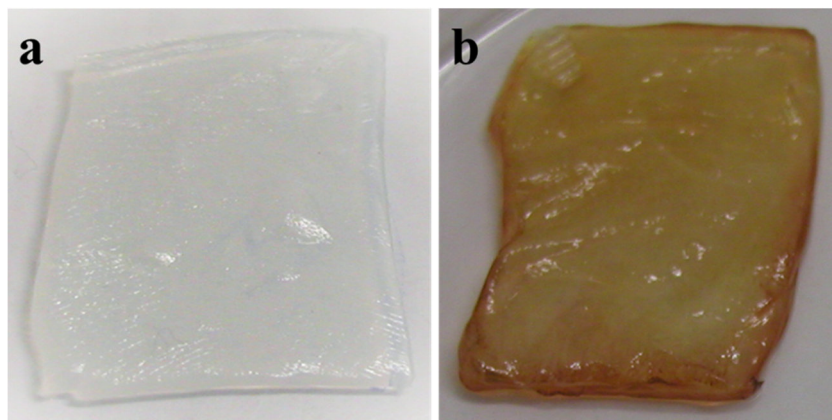


**Figura 2.12** – Imagem de SEM do nanocompósito CV//Ag<sub>1</sub> preparado por LbL a diferentes ampliações: 6 kx (a) e 50 kx (b).

É de salientar que a lavagem dos nanocompósitos em água sob agitação mecânica vigorosa não levou ao desprendimento das NPs da superfície das fibras de CV. Isto indica que as NPs de Ag encontram-se ligadas às fibras celulósicas o que pode estar relacionado com a ligação eletrostática entre a carga negativa das NPs e a carga positiva das fibras de CV com o PDDA à sua superfície. Foi verificado que todas as NPs de Ag que se colocam em solução para aderir à CV acabam por ficar à superfície deste substrato uma vez que a cor da solução passa de amarela a transparente. Isto

dá uma indicação clara de que utilizando esta metodologia podemos ter um controlo aceitável sobre a quantidade de Ag nos materiais finais em função da quantidade de coloide de Ag que colocamos em solução, nomeadamente para quantidades de colóides inferiores à testada inicialmente.

A possibilidade de aplicação da metodologia de LbL à membrana de CB é também uma abordagem válida, no entanto a estrutura nanofibrilar em forma de esponja deste substrato faz com que seja mais interessante para outro tipo de abordagens nomeadamente a incorporação das NPs de Ag através de difusão. Devido a esta característica foi testada a simples imersão da CB no colóide de prata. A imersão da membrana de CB no coloide de Ag, sob agitação moderada, durante algumas horas mostrou que ocorre a migração das partículas para o interior da membrana dando origem a um substrato de cor amarelada e uma solução aquosa incolor. Este facto, de modo idêntico ao verificado na metodologia de LbL, foi verificado anteriormente em trabalhos similares onde se usaram NPs de Au [20]. Nesse caso, esse processo foi atribuído a um mecanismo de migração das NPs por difusão de massa. Contendo a CB cerca de 98,5% de água [35], esta experiência equivale a colocar uma membrana porosa e flexível que separa o coloide da água existente no seu interior. De modo comparativo foi testado o mesmo procedimento com as fibras de CV não se verificando neste caso a entrada das NPs na estrutura. Este facto demonstra mais uma vez que a diferente estrutura da CV em relação à CB tem grande influência na preparação dos nanocompósitos mesmo quando a metodologia seguida é análoga.



**Figura 2.13** – Fotografias digitais da membrana húmida da CB inicial (a) e do nanocompósito CB/Ag<sub>dif2</sub> obtido após imersão da CB nos colóides de Ag (b).

A Figura 2.13 mostra a fotografia das membranas de CB iniciais e da membrana de CB obtida após a migração das NPs de Ag. A cor obtida nestes nanocompósitos é idêntica à obtida pelo método de LbL e das metodologias *in situ*, variando apenas a intensidade da cor em função da quantidade de Ag que se coloca no material.

### 2.3 Estudos da atividade antibacteriana dos nanocompósitos

Foram realizados estudos da atividade antibacteriana dos nanocompósitos celulose/Ag de modo a comparar as diferentes metodologias de síntese dos nanocompósitos e também a quantidade de Ag nas fibras. Conforme descrito na seção experimental, os nanocompósitos foram colocados em contacto com as suspensões de bactérias, sob agitação constante durante 24 h, sendo adotadas especificamente duas condições de ensaio:

(a) Sem crescimento de bactérias (ausência de nutrientes no meio de cultura, o que deve garantir a sobrevivência das bactérias inoculadas mas não auxilia a sua reprodução);

(b) Com crescimento de bactérias (presença de nutrientes no meio de cultura, o que deve garantir o crescimento da população de bactérias).

Para estas condições foram diferenciados dois tipos de efeitos antibacterianos, nomeadamente: *Bactericida* (redução ou eliminação das bactérias inicialmente inoculadas pelo menos de 1 valor na escala logarítmica no que diz respeito às bactérias inoculadas, CFU T<sub>0</sub>); *Bacteriostático* (inibição do crescimento das bactérias em pelo menos 1 valor na escala logaritmo em relação à amostra de referência em T<sub>24</sub> - CFU T<sub>24</sub> na amostra de celulose sem Ag) [36].

Inicialmente foram realizados testes preliminares na amostra de CV//Ag<sub>1</sub> (obtida através da metodologia de LbL) e na amostra CB/Ag<sub>bor1</sub> uma vez que ambas apresentavam teores de prata mais elevados (cerca de 0,57% e 4,4% m/m, respetivamente). Conforme descrito na Tabela 2.2 foi verificada uma forte atividade antibacteriana tanto para a *S. aureus* como para a *K. pneumoniae* verificando-se a inativação de todas as bactérias. Nas amostras de controlo (fibras de celulose iniciais de CB e CV, sem prata), não houve qualquer redução do número de bactérias. Em particular na referência de CB após a incubação verificou-se o aumento do crescimento de bactérias em mais de 1 valor na escala logarítmica (Figura 2.14).

**Tabela 2.2** – Efeito antibacteriano dos nanocompósitos celulose/prata.

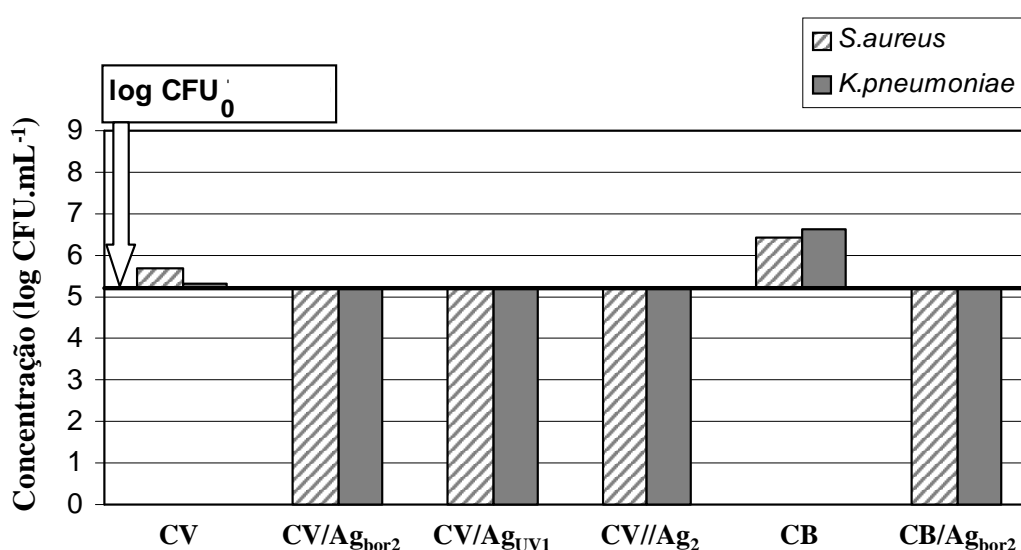
Código da amostra	Ag (% m/m)	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (Gram +)		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352 (Gram -)	
		log CFU T <sub>24</sub>	log da redução*	log CFU T <sub>24</sub>	log da redução*
Referência de CV	-	5,68	0,00	5,30	0,00
CV//Ag <sub>1</sub>	0,57	0,00	5,68	0,00	5,30
Referência de CB	-	6,43	0,00	6,64	0,00
CB/Ag <sub>bor1</sub>	4,4	0,00	6,43	0,00	6,64

Número de bactérias inicialmente inoculadas em cada amostra: log CFU T<sub>0</sub> = 5,2.

Condições do teste: ausência de nutrientes no meio de cultura (teste a). Desvio padrão do log CFU T<sub>24</sub>: todos os testes foram realizados em duplicado estando os desvios padrão obtidos compreendidos entre 0 e 0,1;

\* log da redução = log CFU T<sub>24</sub> referência - log CFU T<sub>24</sub> nanocompósito.

Após estes testes preliminares onde foi verificada uma eficácia de 100%, foram realizados diversos testes com *S. aureus* e *K. pneumoniae* em amostras com teores de Ag inferiores. Foram testados nanocompósitos preparados por diferentes metodologias mas ao mesmo tempo com quantidade de Ag dentro da mesma ordem de grandeza (neste caso entre  $3,3 \times 10^{-3} \%$  a  $8,5 \times 10^{-3} \%$  m/m) de modo a estudar o efeito da metodologia na atividade antibacteriana (Figura 2.14). Verificou-se que no caso de ser adotado o teste do tipo a (condições sem crescimento de bactérias – ausência de nutrientes no meio de cultura) de modo a evidenciar melhor o efeito bactericida, obtêm-se fortes atividades antibacterianas para estas bactérias mesmo com quantidades de Ag reduzidas, independentemente da metodologia de preparação ou do tipo de substrato usado.



**Figura 2.14** – Atividade antibacteriana das amostras de referência e dos nanocompósitos contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Os testes foram realizados em 300 mg para amostras com CV e 50 mg para as amostras à base de CB.

No entanto, uma vez que não se detetaram bactérias vivas após 24h em contacto com as amostras sintetizadas não se pode comparar o efeito das metodologias de preparação nem o efeito do substrato (diferença morfológica).

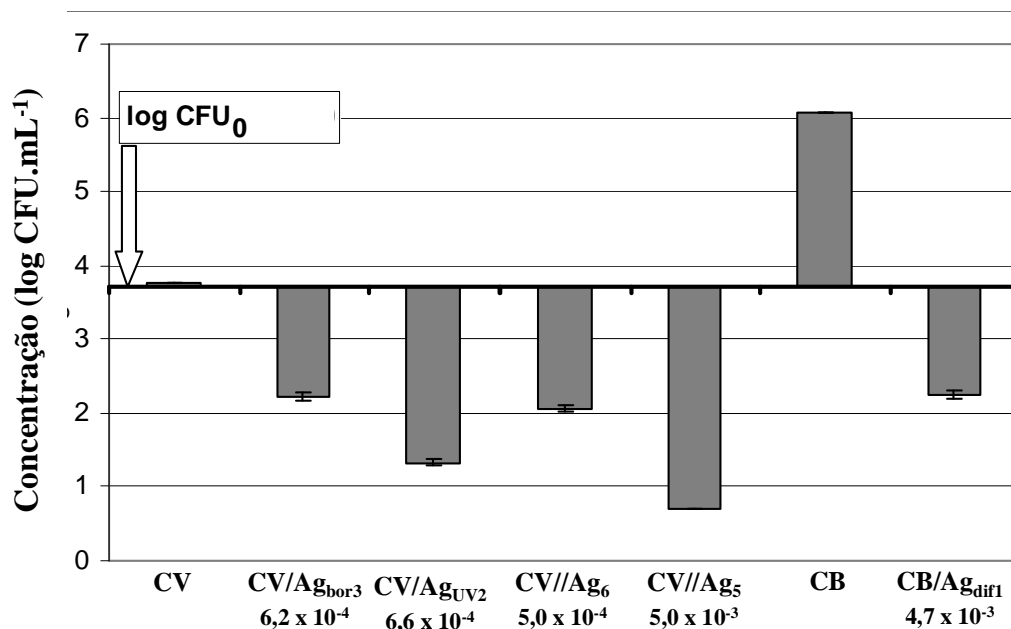
Como se pode observar na Tabela 2.2 e na Figura 2.14, a referência de CV não promove de forma significativa o crescimento das bactérias durante o ensaio. No entanto, no caso da referência de CB verificou-se um crescimento significativo de bactérias, o que poderá dever-se à presença de nutrientes na manta de CB provenientes do processo de produção. Estes resultados indicam que os testes antibacterianos realizados para as amostras contendo CB foram caracterizados por condições que favorecem o crescimento de bactérias. Por esse motivo pode-se aferir que, ambos os nanocompósitos com a CB apresentam atividade bactericida. Comparando os resultados obtidos

com as amostras de CV, deve referir-se que a massa de nanocompósitos com CB que foram testados foi sempre inferior (50 mg em vez de 300 mg de fibras).

De modo a distinguir eventuais diferenças na atividade antibacteriana em relação à metodologia utilizada para a síntese dos nanocompósitos foram testadas concentrações de Ag mais reduzidas (por volta de  $10^{-4}\%$  m/m) usando a bactéria esporulada *B. subtilis* e adotando-se de igual modo o meio de teste com ausência de nutrientes (Figura 2.15).

Para as amostras à base de CV, comparando-se a mesma gama de concentração ( $10^{-4}\%$  m/m), a amostra que demonstrou a maior redução do número de bactérias (redução do valor do logaritmo  $> 2$ ) foi a obtida pela redução do Ag(I) por UV (CV/Ag<sub>UV2</sub>). As amostras que apresentaram menor redução foram as preparadas pelos métodos de redução do Ag(I) com borohidreto (CV/Ag<sub>bor3</sub>) e por LbL (CV//Ag<sub>6</sub>). Esta observação não está de acordo com alguns trabalhos que referem que o facto da aglomeração das NPs diminui significativamente a atividade antibacteriana devido à lenta libertação de iões Ag<sup>+</sup> da superfície dos aglomerados [37].

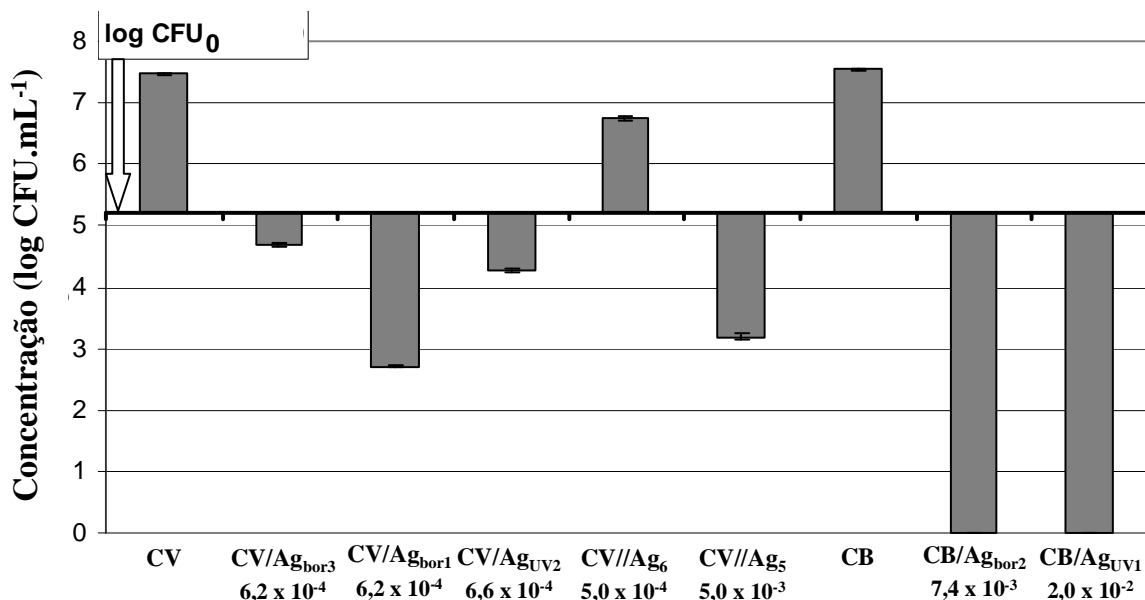
No entanto, este estudo demonstrou claramente a importância da concentração de Ag na atividade antibacteriana. Pelos dados obtidos nas amostras preparadas pela metodologia de LbL (CV//Ag<sub>6</sub> e CV//Ag<sub>5</sub>) o aumento de uma ordem de grandeza na concentração de Ag, de  $5,0 \times 10^{-4}\%$  para  $5,0 \times 10^{-3}\%$ , resultou no aumento do efeito bactericida de 1,7 para 3,1 (valores do logaritmo da redução de bactérias) em relação à amostra de referência.



**Figura 2.15** – Atividade antibacteriana das amostras de referência e dos nanocompósitos celulose/Ag contra *B. subtilis* (teste a). Na figura foram incluídos os teores finais em Ag dos nanocompósitos (% m/m).

A Figura 2.15 apresenta os resultados obtidos para a amostra CB/Ag<sub>diff</sub> onde a CB é usada como matriz. Como observado anteriormente, a referência de CB mostrou um crescimento bacteriano significativo enquanto o correspondente nanocompósito com Ag, caracterizado por uma concentração de Ag de  $4,7 \times 10^{-3}\%$  (m/m), mostrou uma redução global de 3,9 (valor do logaritmo da redução de bactérias) em relação à amostra de referência, apresentando este nanocompósito novamente um efeito bactericida.

De modo a caracterizar a atividade bacteriostática nas amostras com CV foram realizados testes em condições de crescimento de bactérias (teste b) sendo os resultados obtidos mostrados na Figura 2.16. Como consequência da presença de nutrientes no meio de teste, a referência de CV mostrou um aumento significativo do crescimento de bactérias (correspondente a 2,3 do valor do logaritmo da redução de bactérias). Para as amostras caracterizadas por concentrações de Ag entre  $5,0 \times 10^{-4}\%$  e  $6,6 \times 10^{-4}\%$  (m/m) apenas a CV/Ag<sub>bor3</sub> e CV/Ag<sub>UV2</sub> demonstram uma inibição do crescimento de bactérias (atividade bacteriostática) mas, entre estas, apenas foi verificada atividade bactericida para a amostra CV/Ag<sub>UV2</sub> (redução de 1 valor na escala logarítmica em relação ao log CFU<sub>0</sub> [36]). A amostra CV//Ag<sub>6</sub> apesar de uma concentração de Ag semelhante às anteriores ( $5,0 \times 10^{-4}\%$ ) apresentou uma redução do número de bactérias bastante mais reduzido (apenas redução de 0,8 no valor do logaritmo). No entanto, aumentando a concentração de Ag até  $5,0 \times 10^{-3}\%$  (CV//Ag<sub>5</sub>), evidenciou-se uma forte atividade bactericida.

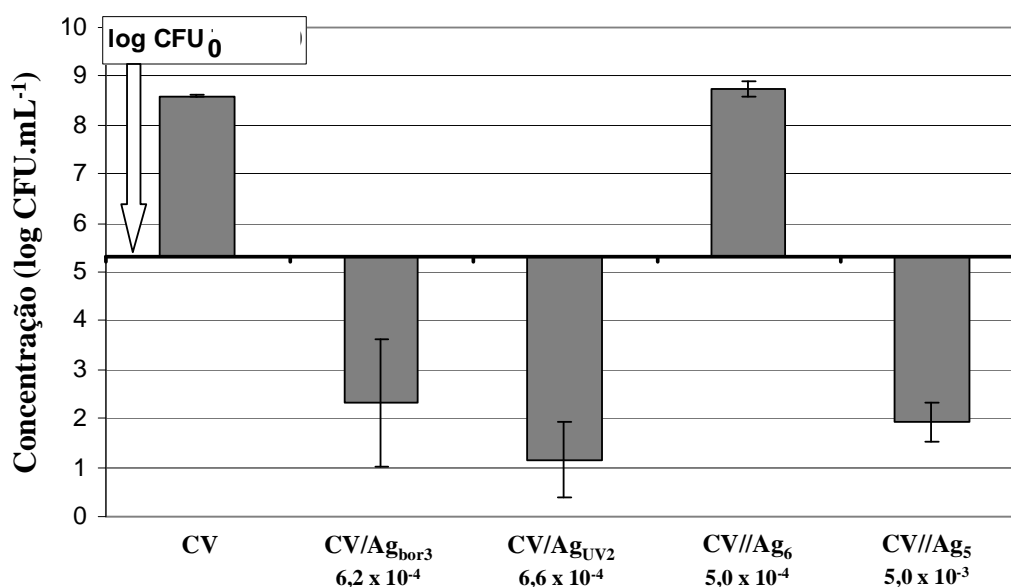


**Figura 2.16** – Atividade antibacteriana das amostras de referência e dos nanocompósitos celulose/Ag contra *S. aureus* (teste b). Na figura foram incluídos os teores finais em Ag dos nanocompósitos (% m/m).

O importante efeito da concentração de Ag foi mais uma vez corroborado com as amostras CV/Ag<sub>bor</sub>. No nanocompósito CV/Ag<sub>bor3</sub> um teor de  $6,2 \times 10^{-4}\%$  (m/m) foi suficiente para garantir a completa inibição do crescimento de bactérias ocorrendo apenas uma ligeira diminuição do número de bactérias contra *S. aureus* enquanto a amostra com maior concentração (CV/Ag<sub>bor1</sub>) mostrou um incremento significativo desse efeito (mais de 2 valores na escala logarítmica). Este facto também é descrito em outros trabalhos com nanocompósitos celulose/Ag [11, 38] onde se verifica um aumento proporcional da atividade antimicrobiana em função da quantidade de Ag. Nestes trabalhos é descrita a importância de outros parâmetros como a distribuição de tamanhos, grau de libertação e interação das NPs com a superfície da celulose para determinar a sua eficiência antimicrobiana. No entanto a quantidade de Ag presente nos nanocompósitos têm-se revelado o parâmetro com mais influência neste efeito.

Na Figura 2.16 são também apresentados resultados obtidos para os nanocompósitos com a CB como matriz. Ambos os nanocompósitos testados, sintetizados por redução com borohidreto e radiação UV, mostraram efeito bacteriostático, mas para além disso, capacidade para matar completamente todas as bactérias no meio de teste.

De modo a testar este tipo de nanocompósitos contra bactérias do tipo Gram negativo, foi testada a atividade antibacteriana para as amostras de CV para a bactéria *K. pneumoniae* em condições de cultivo com crescimento de bactérias (Figura 2.17).



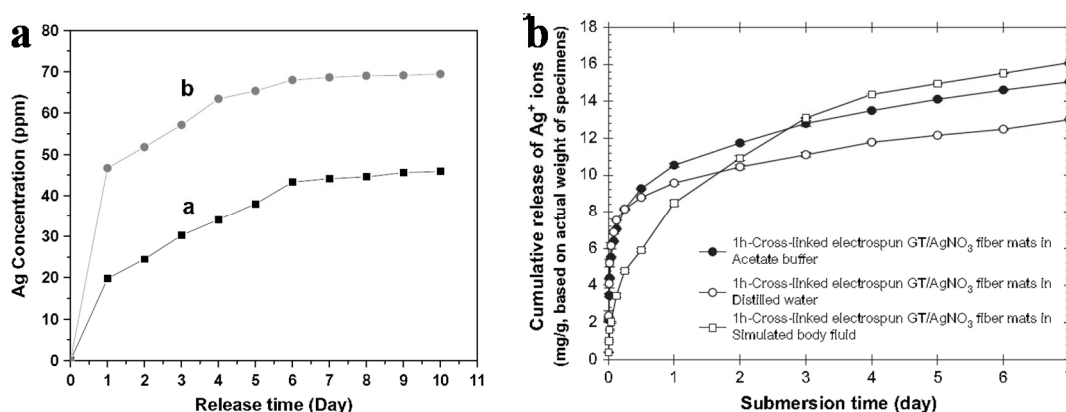
**Figura 2.17** – Atividade antibacteriana da referência de CV e dos nanocompósitos CV/Ag contra *K. pneumoniae* (teste b). Na figura foram incluídos os teores finais em Ag dos nanocompósitos (% m/m).



De igual modo ao verificado nos resultados com a *S. aureus* (Figura 2.16), as amostras CV/Ag<sub>bor3</sub> e CV/Ag<sub>UV2</sub> mostraram atividades antibacterianas estatisticamente maiores em relação à preparada pela metodologia de LbL, para teores finais de Ag com a mesma ordem de grandeza (por volta de 10<sup>-4</sup>%). A amostra CV//Ag<sub>6</sub> não mostrou efeito bacteriostático enquanto as amostras CV/Ag<sub>bor3</sub> e CV/Ag<sub>UV2</sub> mostraram um efeito bactericida significativo. No entanto, pode-se verificar que nos nanocompósitos obtidos pela metodologia de LbL podem ser obtidas atividades antibacterianas similares através do aumento da concentração de Ag em pelo menos uma ordem de magnitude (CV//Ag<sub>5</sub>).

## 2.4 Estudos de liberação catiônica de Ag pelos nanocompósitos

Como referenciado por alguns autores [11, 12], a liberação de Ag(I) é um dos mecanismos propostos para explicar a atividade antibacteriana dos materiais com Ag. Estes trabalhos mostram que uma característica importante neste tipo de materiais, quando se tem em vista a possível utilização em aplicações antibacterianas, é a permanência da atividade antibacteriana ao longo do tempo e/ou após a imersão destes materiais em meios aquosos. Para se conseguir uma atividade eficiente é necessária uma liberação de Ag(I) estável e prolongada numa concentração adequada; uma liberação rápida ou muito rápida de íons de Ag poderá ser inconveniente para diversos tipos de aplicações (Figura 2.18).



**Figura 2.18** – Exemplos do comportamento de liberação de Ag(I) para fibras de poliácrlonitrilo/Ag (concentração de AgNO<sub>3</sub>: a) 0,5% e b) 1,25%) [39] e fibras de gelatina/Ag [40].

A prata metálica é relativamente não reativa, no entanto, em ambientes aquosos, podem ser libertados íons Ag<sup>+</sup> e, neste caso, a atividade antibacteriana dependerá da acumulação intracelular destes íons [41]. De modo a estudar a velocidade de liberação dos íons Ag<sup>+</sup> destes novos materiais,

foram selecionados nanocompósitos preparados por diferentes metodologias e imersos em soro fisiológico a 37 °C durante um período de tempo até 48 h e medida a concentração de Ag(I) para os vários tempos estudados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.3, Tabela 2.4 e Figura 2.19.

**Tabela 2.3** – Liberação de Ag(I) dos nanocompósitos CV/Ag em função do tempo de imersão.

Tempo de imersão (h)	<i>Redução do Ag<sup>+</sup> com borohidreto</i>		<i>Pós-deposição das NPs de Ag (LbL)</i>	
	Quantidade de Ag <sup>+</sup> libertada (mg) <sup>a</sup>	Fração de Ag <sup>+</sup> <sub>b</sub> libertada	Quantidade de Ag <sup>+</sup> libertada (mg) <sup>a</sup>	Fração de Ag <sup>+</sup> <sub>c</sub> libertada
0	0	0	0	0
6	1,37x10 <sup>-3</sup>	0,0846	1,60x10 <sup>-3</sup>	0,0675
24	1,68x10 <sup>-3</sup>	0,179	3,30x10 <sup>-3</sup>	0,139
48	4,68x10 <sup>-3</sup>	0,289	4,70x10 <sup>-3</sup>	0,198

<sup>a</sup> A partir de 100 mg de nanocompósito imerso em 10 mL de solução.

<sup>b</sup> Relativa à quantidade total de Ag em 100 mg do nanocompósito CV/Ag<sub>bor4</sub> (0,0162 mg).

<sup>c</sup> Relativa à quantidade total de Ag em 100 mg do nanocompósito CV//Ag<sub>7</sub> (0,0237 mg).

**Tabela 2.4** – Liberação de Ag(I) dos nanocompósitos CB/Ag em função do tempo de imersão.

Tempo de imersão (h)	<i>Redução do Ag<sup>+</sup> com borohidreto</i>		<i>Difusão das NPs de Ag</i>		<i>Redução do Ag<sup>+</sup> sob radiação UV</i>	
	Quantidade de Ag <sup>+</sup> libertada (mg) <sup>a</sup>	Fração de Ag <sup>+</sup> <sub>b</sub> libertada	Quantidade de Ag <sup>+</sup> libertada (mg) <sup>a</sup>	Fração de Ag <sup>+</sup> <sub>c</sub> libertada	Quantidade de Ag <sup>+</sup> libertada (mg) <sup>a</sup>	Fração de Ag <sup>+</sup> <sub>d</sub> libertada
0	0	0	0	0	0	0
6	8,34x10 <sup>-4</sup>	0,0361	1,13x10 <sup>-3</sup>	0,0876	9,76x10 <sup>-4</sup>	0,160
24	2,66x10 <sup>-3</sup>	0,115	1,92x10 <sup>-3</sup>	0,149	2,38x10 <sup>-3</sup>	0,390
48	3,51x10 <sup>-3</sup>	0,152	2,75x10 <sup>-3</sup>	0,213	2,74x10 <sup>-3</sup>	0,449

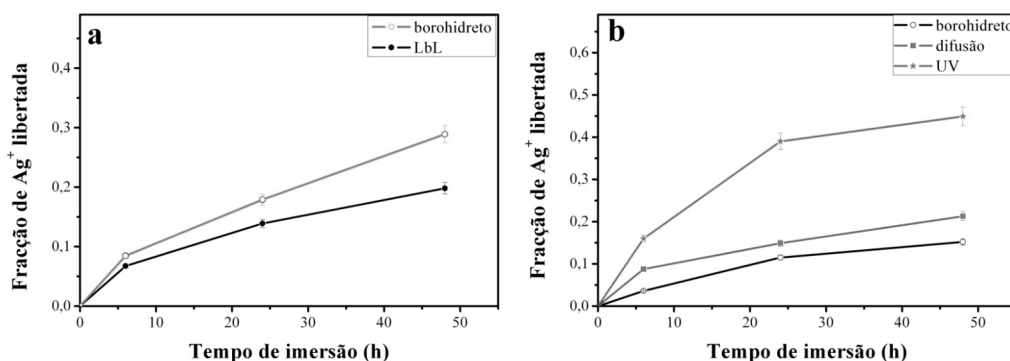
<sup>a</sup> A partir de 10 mg de nanocompósito imerso em 10 mL de solução.

<sup>b</sup> Relativa à quantidade total de Ag em 10 mg do nanocompósito CB/Ag<sub>bor3</sub> (0,0231 mg).

<sup>c</sup> Relativa à quantidade total de Ag em 10 mg do nanocompósito CB/Ag<sub>dif2</sub> (0,0129 mg).

<sup>d</sup> Relativa à quantidade total de Ag em 10 mg do nanocompósito CB/Ag<sub>UV4</sub> (0,0061 mg).

Os resultados obtidos mostraram que os iões Ag<sup>+</sup> são libertados dos nanocompósitos para a solução salina através de difusão, sendo estes resultados apoiados pelos observados por outros grupos para outros compósitos de composição semelhante [11, 12]. Como se pode observar todos os nanocompósitos libertam, em períodos de tempo relativamente curtos (24 h), mais de 10% da quantidade total de Ag.



**Figura 2.19** – Fração de  $Ag^+$  libertada em função do tempo para: nanocompósitos CV/Ag obtidos através da metodologia de redução com borohidreto ( $Ag_{bor4}$ ) e LbL ( $Ag_7$ ) (a) e nanocompósitos CB/Ag obtidos através da redução com borohidreto ( $Ag_{bor3}$ ), difusão ( $Ag_{dif2}$ ) e redução sob radiação UV ( $Ag_{UV4}$ ) (b).

A partir destes resultados podemos também observar que a fração de  $Ag^+$  libertada é distinta em função da metodologia empregue na preparação dos nanocompósitos. No caso dos nanocompósitos com CV, verificou-se que o nanocompósito preparado por redução de  $Ag(I)$  com borohidreto apresentou uma libertação superior à verificada no nanocompósito preparado por LbL. Uma vez que a teor de  $Ag$  neste nanocompósito (CV/ $Ag_{bor4}$ ) é inferior ao nanocompósito CV// $Ag_7$  esta diferença poderá dever-se à ligação da prata à celulose no caso dos nanocompósitos preparados por LbL ser mais eficaz.

No caso dos nanocompósitos com CB verificou-se que também existem diferenças entre as amostras estudadas. Comparando a libertação na amostra CB/ $Ag_{UV4}$  com as amostras CB/ $Ag_{bor3}$  e CB/ $Ag_{dif2}$ , em 48 h, o valor obtido é mais de duas vezes superior no caso da primeira amostra. Esta observação é ainda mais significativa se repararmos no facto da quantidade inicial no nanocompósito obtido pela redução sob radiação UV ser substancialmente inferior ao obtido para o obtido pela redução com borohidreto (cerca de quatro vezes) e ao obtido por difusão (cerca de duas vezes). Este facto poderá dever-se a que neste nanocompósito as NPs, como foi descrito anteriormente, terem tendência a formar-se na superfície do substrato sob a forma de aglomerados. O facto do nanocompósito CB/ $Ag_{UV4}$  libertar mais rapidamente os iões  $Ag^+$  pode explicar a maior atividade antibacteriana verificada para os nanocompósitos preparados por esta metodologia.

A taxa de difusão de  $Ag^+$  num determinado material compósito depende de diversas variáveis, nomeadamente do teor de  $Ag$ , da natureza da fase orgânica assim como da arquitetura molecular e morfologia do mesmo [11, 12]. De facto, este último parâmetro pode ser verificado, neste estudo, através da comparação de nanocompósitos preparados a partir de diferentes substratos celulósicos mas usando a mesma metodologia de síntese. Observou-se que o nanocompósito

CB/Ag<sub>bor3</sub> preparado pela redução do Ag(I) com borohidreto apresentou uma libertação de prata menor quando comparado com o nanocompósito análogo preparado com CV. Este facto poderá dever-se a que no caso do nanocompósito CV/Ag existe um filme de Ag apenas na superfície da fibra enquanto no caso do nanocompósito análogo com CB as NPs de Ag, devido sobretudo à sua estrutura interna 3D, também estão “presas” dentro da própria estrutura levando a uma libertação de Ag(I) mais lenta. É de salientar contudo que o teor de Ag é menor no caso da amostra CV/Ag<sub>bor4</sub> em relação ao análogo com CB (CB/Ag<sub>bor3</sub>).

Os testes realizados para a libertação de Ag<sup>+</sup> nos nanocompósitos com CV (Figura 2.19) evidenciaram uma libertação menor para as amostras preparadas pelo método de LbL, apesar de esta amostra apresentar uma quantidade inicial de Ag maior que a preparada pelo método *in situ*. Isto poderá indicar que, neste caso, será necessária uma quantidade de Ag ainda superior na amostra de modo a assegurar uma libertação de Ag<sup>+</sup> idêntica à obtida para outras metodologias. Este facto poderá explicar a baixa atividade antibacteriana obtida nas amostras preparadas por esta metodologia.

### 2.3. Conclusões

Foi demonstrado que nanocompósitos de Ag preparados com base na CV e na CB apresentam uma atividade antibacteriana significativa contra diferentes espécies de bactérias do tipo Gram-negativo (*K. pneumoniae*) e Gram-positivo (*S. aureus* e bactérias formadoras de esporos *B. subtilis*).

De entre as amostras analisadas com base na CV, as preparadas pelos métodos de redução com borohidreto e sob radiação UV, demonstraram ser relativamente eficazes mesmo com baixos teores de Ag ( $10^{-4}\%$  m/m), enquanto as amostras preparadas pela metodologia de LbL apenas mostraram atividades antibacterianas comparáveis quando se aumentou o teor de Ag nos nanocompósitos pelo menos em uma ordem de grandeza. De igual modo para as amostras com base na CB as preparadas pelos métodos de redução com borohidreto e sob radiação UV foram as que mostraram ser mais eficazes para teores de Ag análogos.

A partir dos resultados obtidos também se pode concluir que controlando a concentração de Ag nos nanocompósitos, a atividade bacteriostática (inibição do crescimento de bactérias) e/ou bactericida (morte das bactérias inoculadas) podem ser obtidas mas ao mesmo tempo ser moduladas. A concentração de Ag pode ser controlada usando diferentes metodologias de síntese e/ou diferentes tipos de substratos. Desta forma, é possível controlar também a velocidade de liberação de prata, sendo este um ponto-chave em diversos tipos de aplicações que têm em vista as propriedades antibacterianas.

De acordo com estes resultados, espera-se que estes nanocompósitos celulose/prata possam ser usados em aplicações interessantes como materiais para cicatrização, biofilmes com liberação controlada ou mesmo como revestimento de utensílios médicos.

## 2.4. Referências

- [1] Kim J, Yun S, Ounaies Z. Discovery of cellulose as a smart material. *Macromolecules* **2006** 39, 4202-4206.
- [2] Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2005** 44, 3358-3393.
- [3] Roberts JC, editor. Paper Chemistry. Glasgow: Blackie; **1996**.
- [4] Sjöström E. WOOD CHEMISTRY Fundamentals and Applications. Second ed. London: Academic Press; **1993**.
- [5] Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *J. Biomed. Mater. Res.* **1989** 23, 125-133.
- [6] Bledzki AK, Gassan J. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Prog. Polym. Sci.* **1999** 24, 221-274.
- [7] Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **2006** 27, 145-151.
- [8] Iguchi M, Yamanaka S, Budhiono A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. *J. Mater. Sci.* **2000** 35, 261-270.
- [9] Sokolnicki AM, Fisher RJ, Harrah TP, Kaplan DL. Permeability of bacterial cellulose membranes. *J. Membr. Sci.* **2006** 272, 15-27.
- [10] Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* **2001** 26, 1561-1603.
- [11] Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2008** 72, 43-51.
- [12] Marini M, De Niederhausen S, Iseppi R, Bondi M, Sabia C, Toselli M, et al. Antibacterial activity of plastics coated with silver-doped organic-inorganic hybrid coatings prepared by sol-gel processes. *Biomacromolecules* **2007** 8, 1246-1254.
- [13] Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* **2008** 24, 2051-2056.
- [14] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005** 16, 2346-2353.
- [15] Thiel J, Pakstis L, Buzby S, Raffi M, Ni C, Pochan DJ, et al. Antibacterial properties of silver-doped titania. *Small* **2007** 3, 799-803.
- [16] He JH, Kunitake T, Nakao A. Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chem. Mater.* **2003** 15, 4401-4406.

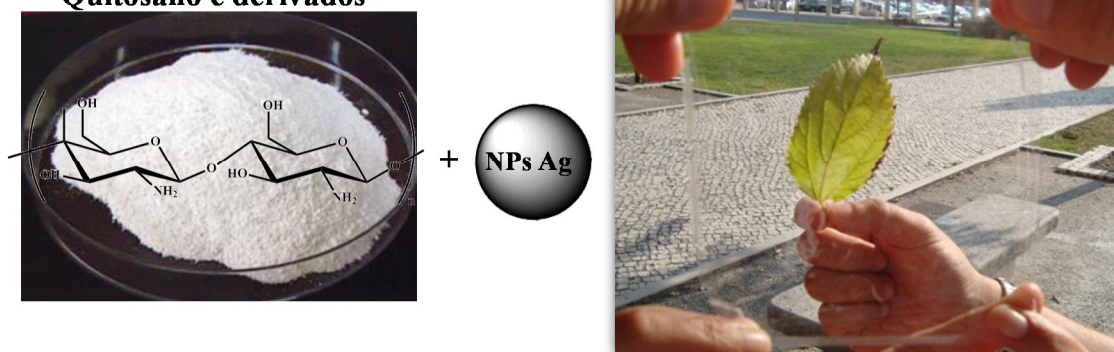
- [17] Dong H, Hinestroza JP. Metal Nanoparticles on Natural Cellulose Fibers: Electrostatic Assembly and In Situ Synthesis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009** 1, 797-803.
- [18] Creighton JA, Blatchford CG, Albrecht MG. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1979** 75, 790-798.
- [19] Marques P, Nogueira HIS, Pinto RJB, Neto CP, Trindade T. Silver-bacterial cellulosic sponges as active SERS substrates. *J. Raman Spectrosc.* **2008** 39, 439-443.
- [20] Pinto RJB, Marques PAAP, Martins MA, Neto CP, Trindade T. Electrostatic assembly and growth of gold nanoparticles in cellulosic fibres. *J. Colloid Interface Sci.* **2007** 312, 506-512.
- [21] Shameli K, Bin Ahmad M, Zargar M, Yunus W, Ibrahim NA, Shabanzadeh P, et al. Synthesis and characterization of silver/montmorillonite/chitosan bionanocomposites by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int. J. Nanomed.* **2011** 6, 271-284.
- [22] Guang-nian X, Xue-liang Q, Xiao-lin Q, Jian-guo C. Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* **2008** 320, 222-226.
- [23] Liu ZX, Wang HH, Li H, Wang XM. Red shift of plasmon resonance frequency due to the interacting Ag nanoparticles embedded in single crystal SiO<sub>2</sub> by implantation. *Appl. Phys. Lett.* **1998** 72, 1823-1825.
- [24] Rycenga M, Cobley CM, Zeng J, Li W, Moran CH, Zhang Q, et al. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. *Chem. Rev.* **2011** 111, 3669-3712.
- [25] Khlebtsov NG, Dykman LA. Plasmonic Nanoparticles: Fabrication, Optical Properties, and Biomedical Applications. In: Tuchin VV, editor. *Handbook of Photonics for Biomedical Science*. 1 ed: CRC Press; **2010**. p. 37-85.
- [26] Omrani AA, Taghavinia N. Photo-induced growth of silver nanoparticles using UV sensitivity of cellulose fibers. *Appl. Surf. Sci.* **2012** 258, 2373-2377.
- [27] Son WK, Youk JH, Park WH. Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2006** 65, 430-434.
- [28] Kongruang S, Penner MH. Borohydride reactivity of cellulose reducing ends. *Carbohydr. Polym.* **2004** 58, 131-138.
- [29] Maria LCS, Santos ALC, Oliveira PC, Valle ASS, Barud HS, Messaddeq Y, et al. Preparation and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Impregnated in Bacterial Cellulose. *Polimeros* **2010** 20, 72-77.
- [30] Ferrara AM, Boufi S, Battaglini N, Botelho do Rego AM, ReiVilar M. Hybrid Systems of Silver Nanoparticles Generated on Cellulose Surfaces. *Langmuir* **2010** 26, 1996-2001.

- [31] Li SK, Shen YH, Xie AJ, Yu XR, Qiu LG, Zhang L, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chem.* **2007** 9, 852-858.
- [32] Cunha AG, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP, Gandini A, Orblin E, et al. Highly hydrophobic biopolymers prepared by the surface pentafluorobenzoylation of cellulose substrates. *Biomacromolecules* **2007** 8, 1347-1352.
- [33] Barud HS, Ribeiro CA, Crespi MS, Martines MAU, Dexpert-Ghys J, Marques RFC, et al. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2007** 87, 815-818.
- [34] Ribitsch V, Stana-Kleinschek K, Kreze T, Strnad S. The significance of surface charge and structure on the accessibility of cellulose fibres. *Macromol. Mater. Eng.* **2001** 286, 648-654.
- [35] Belgacem MN, Gandini A. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources: Elsevier; **2008**.
- [36] Determination of the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions (BISFA 2002, chapter 4.4, quantitative method B; ASTM E 2149:2001).
- [37] Klemencic D, Simoncic B, Tomsic B, Orel B. Biodegradation of silver functionalised cellulose fibres. *Carbohydr. Polym.* **2010** 80, 426-435.
- [38] Ying Hui N, Li D, Simon GP, Gamier G. Paper surfaces functionalized by nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011** 163, 23-38.
- [39] Shi Q, Vitchuli N, Nowak J, Caldwell JM, Breidt F, Bourham M, et al. Durable antibacterial Ag/polyacrylonitrile (Ag/PAN) hybrid nanofibers prepared by atmospheric plasma treatment and electrospinning. *Eur. Polym. J.* **2011** 47, 1402-1409.
- [40] Rujitanaroj P-o, Pimpha N, Supaphol P. Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. *Polymer* **2008** 49, 4723-4732.
- [41] Kumar R, Howdle S, Munstedt H. Polyamide/silver antimicrobials: Effect of filler types on the silver ion release. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* **2005** 75B, 311-319.



## Capítulo 3

**Quitosano e derivados**



### ***ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FILMES COMPÓSITOS À BASE DE QUITOSANO OU DERIVADOS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OURO***

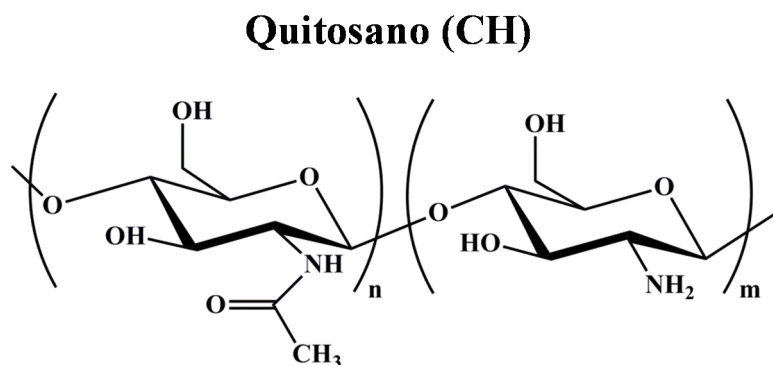
Neste capítulo descreve-se a preparação e caracterização de nanocompósitos à base de quitosano e NPs de Ag e Au. Para a preparação dos nanocompósitos foram estudados como matriz o quitosano e dois derivados de quitosano obtidos por modificação química, um derivado solúvel em água e um derivado anfifílico. Os compósitos foram obtidos usando-se dois métodos distintos para a síntese das NPs de Ag. Os filmes foram caracterizados morfológica e quimicamente tendo sido avaliada a sua atividade antibacteriana contra diferentes micro-organismos *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Foi estudada a influência de diversos parâmetros como o teor de Ag, o tamanho médio das NPs e o tipo de matriz usada na atividade antibacteriana dos materiais preparados. Os nanocompósitos quitosano/Au foram preparados de modo a testar comparativamente outro tipo de NPs metálicas.

**CAPÍTULO 3 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FILMES COMPÓSITOS À BASE DE QUITOSANO  
OU DERIVADOS E NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OURO**

3.1 Introdução.....	83
3.2 Preparação e caracterização de nanocompósitos quitosano/Ag.....	87
3.3 Estudo da atividade antibacteriana dos nanocompósitos quitosano/Ag.....	94
3.4. Nanocompósitos quitosano/Au .....	100
3.5. Conclusões.....	104
3.6. Referências .....	105

### 3.1 Introdução

O quitosano é um polissacarídeo linear obtido por desacetilação da quitina (segundo biopolímero mais abundante na Natureza) sendo composto por unidades de glucosamina e *N*-acetil glucosamina, as quais estão ligadas através de ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4) (Figura 3.1). A percentagem de grupos glucosamina é também chamada de grau de desacetilação (GD). De uma maneira geral quando o GD da quitina é superior a 50% (dependendo da origem do polímero e da distribuição dos grupos acetilo ao longo das cadeias), esta é denominada de quitosano [1]. Além da própria definição dos dois biopolímeros depender deste parâmetro, o GD influencia o seu comportamento, nomeadamente a reatividade e a solubilidade, sendo por isso um processo usado no controlo da sua produção [2].



**Figura 3.1** – Estrutura química da unidade básica do quitosano.

A quitina é um dos constituintes estruturais do exosqueleto de alguns animais nomeadamente crustáceos, moluscos e insetos, sendo também o principal polímero fibrilar das paredes celulares de alguns fungos [1, 3]. No entanto, a quitina apresenta uma grande desvantagem em termos de aplicabilidade em relação ao quitosano pois é insolúvel em praticamente todos os solventes [4].

O quitosano apresenta propriedades muito interessantes do ponto de vista tecnológico como excelentes características filmogénicas, biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana [5, 6]. A sua aplicabilidade prática em diversas áreas é conhecida, nomeadamente como material antimicrobiano na agricultura, agente floculante no tratamento de águas residuais, aditivo na indústria alimentar, agente hidratante em cosméticos ou na indústria farmacêutica, entre outros. No entanto, as suas aplicações, principalmente na área biomédica, são limitadas devido a ser insolúvel em água (é solúvel apenas em soluções de ácidos orgânicos diluídos), apresentar uma viscosidade elevada e ter tendência para coagular com as proteínas a pH elevado [1, 7].

Devido a este facto, o interesse na modificação química do quitosano tem vindo a crescer tendo em vista o aumento da sua solubilidade em água e melhoria das propriedades antibacterianas e antioxidantes, alargando a sua biocompatibilidade e consequente campo de aplicabilidade. O quitosano possui dois tipos de grupos funcionais distintos que permitem a sua modificação química nomeadamente os grupos amina das unidades desacetiladas e os grupos hidroxilo das posições C3 e C6 (Figura 3.1) [7-9].

A derivatização através da introdução de grupos funcionais na estrutura do quitosano como grupos alquilo [10], carboximetilo [11] pode aumentar drasticamente a solubilidade deste biopolímero em pH neutros e alcalinos. Nos últimos anos têm sido preparados um elevado número de derivados de quitosano com funcionalidades distintas levando ao desenvolvimento de materiais funcionais com base neste polissacarídeo. Alguns exemplos relevantes da aplicação de derivados do quitosano são na engenharia de tecidos [12], na libertação controlada de fármacos [13, 14] e em aplicações ambientais (recuperação de metais valiosos ou tratamento de afluentes contaminados) [8, 15].

Uma vantagem decorrente do uso do quitosano e dos seus derivados é o uso como agentes antimicrobianos. Estes biopolímeros têm sido testados contra uma variada gama de organismos como algas, bactérias, leveduras e fungos, em testes *in vitro* e *in vivo*, usando o quitosano em formas distintas (soluções, filmes e compósitos). Geralmente os derivados modificados apresentam uma maior atividade antimicrobiana em relação ao quitosano puro [1, 9, 16].

O mecanismo exato da ação antimicrobiana do quitosano e dos seus derivados ainda é desconhecido. Alguns mecanismos propostos apontam para a formação de uma barreira externa que capta os nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos micro-organismos devido às excelentes propriedades quelantes do quitosano [17] ou passagem do quitosano através da parede celular, penetrando no núcleo dos micro-organismos inibindo o ARNm e a síntese de proteínas [18]. No entanto, a proposta de mecanismo mais consensual baseia-se na interação entre as cargas positivas dos biopolímeros e as cargas negativas das membranas celulares microbianas. Neste modelo as interações ocorrem através de forças eletrostáticas entre grupos protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ) destes derivados e resíduos negativos dos micro-organismos [19], presumivelmente competindo com os iões  $\text{Ca}^{2+}$  pelas cargas negativas da superfície da membrana. As interações eletrostáticas provocam um efeito duplo, nomeadamente:

- Alteração das propriedades de permeabilidade da parede da membrana provocando desequilíbrios osmóticos internos e, consequentemente, inibindo o crescimento dos micro-organismos;

- Hidrólise dos peptidoglicanos da parede dos micro-organismos levando à perda de eletrólitos intracelulares como os iões potássio e outros constituintes celulares de baixo peso molecular [9].

A mistura do quitosano com diferentes NPs inorgânicas [6, 20-23] é uma estratégia usada para sintetizar estruturas compósitas que beneficiem das suas propriedades individuais e da possível sinergia entre as unidades orgânica e inorgânica, levando ao desenvolvimento de novos materiais funcionais [24]. Em particular, a incorporação de NPs de Ag nestes biopolímeros tem sido uma metodologia usada para a preparação de materiais com uma atividade antimicrobiana reforçada [25]. Neste caso o interesse na aplicação justifica-se pelo facto dos micro-organismos não conseguirem desenvolver resistência a este elemento, ao contrário do verificado com a maioria dos antibióticos e materiais bactericidas devido à prata ser um agente multialvo [22, 25-29].

Alguns destes agentes antimicrobianos são extremamente irritantes e tóxicos para os seres humanos, por isso, é importante desenvolver novos materiais biocidas que sejam inócuos. A síntese destes nanocompósitos antimicrobianos com propriedades físicas e químicas ajustáveis terá muito interesse no desenvolvimento de novos produtos, principalmente na indústria alimentar e farmacêutica [30].

Seguindo os estudos desenvolvidos anteriormente sobre a atividade antibacteriana de nanocompósitos celulose/Ag [27] (capítulo 2), neste capítulo foram estudadas as propriedades antibacterianas de nanocompósitos preparados por incorporação de NPs de Ag em diversas matrizes de quitosano contra bactérias do tipo Gram-positivas e Gram-negativas. Apesar das propriedades antibacterianas de materiais à base de quitosano e NPs de Ag já terem sido objeto de estudo [6, 21, 22, 25, 29, 31, 32], este trabalho distingue-se dos demais pois foca a relação entre as propriedades antimicrobianas e óticas/morfológicas dos filmes compósitos. A influência do uso de quitosano ou de derivados modificados quimicamente na atividade antibacteriana dos nanocompósitos com Ag foi também avaliada. Foram usados dois métodos distintos para a preparação das NPs de Ag usadas como cargas, permitindo analisar o efeito do tamanho médio das NPs incorporadas nos biopolímeros nas propriedades antibacterianas e óticas. O efeito da variação do teor de Ag foi também avaliado.

Foi estudada a incorporação de NPs de Au no filme de quitosano de modo a testar comparativamente outro tipo de NPs metálicas a nível das suas propriedades óticas e antibacterianas.

Este trabalho contribuirá para o desenvolvimento de novos bionanocompósitos à base de quitosano (modificado ou não modificado) e distintas NPs metálicas, nos quais as propriedades óticas e antibacterianas poderão ser ajustadas em função do uso final previsto para os materiais.

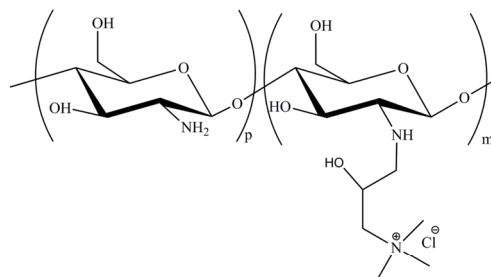
Este capítulo encontra-se dividido em três partes. Na primeira parte será apresentada a preparação e caracterização de filmes compósitos de quitosano/Ag obtidos através de mistura direta das NPs de Ag com a matriz de quitosano (modificada e não modificada quimicamente). Será avaliada a influência de parâmetros como o método de preparação das NPs e o teor de Ag nas propriedades apresentadas pelos diferentes filmes preparados. Na segunda parte será exposto o estudo da atividade antibacteriana dos nanocompósitos anteriormente preparados sendo discutido o efeito das modificações na matriz de quitosano, tamanho das NPs e respetivo teor. Na última parte será discutida a preparação e caracterização de filmes nanocompósitos quitosano/NPs de Au e a sua respetiva atividade antibacteriana.

### 3.2 Preparação e caracterização de nanocompósitos quitosano/Ag

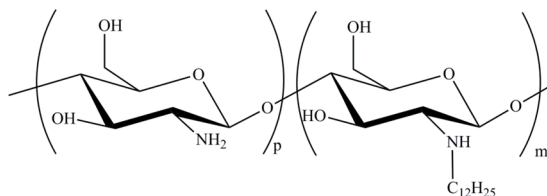
Como referido anteriormente, o quitosano exibe atividade antimicrobiana devido às suas propriedades catiónicas que causam efeitos disruptivos nas membranas celulares [25] e a incorporação de Ag (tanto na forma metálica como iónica) origina materiais com atividade reforçada [21]. Todavia o efeito conjugado de modificações químicas realizadas no biopolímero e a dependência do tamanho e teor das NPs de Ag, nunca foi investigado.

Neste trabalho foram preparados diversos nanocompósitos com base em quitosano e quitosano modificado quimicamente [nomeadamente um derivado quaternário de amónio solúvel em água (HTCCH) e um derivado anfifílico (DCH)] com NPs de Ag. A Figura 3.2 apresenta as estruturas químicas do quitosano e dos respetivos derivados modificados quimicamente.

**Cloreto de *N*-[(2-hidroxi-3-trimetilamónio)propil]quitosano (HTCCH)**



***N*-dodecil quitosano (DCH)**



**Figura 3.2** – Estruturas químicas da unidade básica dos derivados modificados do quitosano.

Como o quitosano não é solúvel em água, foi preparado um derivado deste biopolímero na forma de um sal de amónio quaternário solúvel a pH neutro. Os nanocompósitos foram preparados em meio aquoso por mistura do quitosano com os colóides de Ag. Os materiais finais foram obtidos na forma de filmes, no entanto o nanocompósito preparado com base no derivado anfifílico não deu origem à formação de um filme compacto mas em listras. Apesar deste facto, tendo em vista uma análise comparativa, estes materiais foram caracterizados e posteriormente analisados a nível das suas propriedades antibacterianas. A Tabela 3.1 descreve os nanocompósitos estudados neste trabalho assim como o método de síntese das NPs de Ag, o teor de Ag e respetiva espessura dos filmes.

**Tabela 3.1** – Caracterização do filme de quitosano e dos derivados e respectivos nanocompósitos com Ag.

Amostra	Método de síntese das NPs Ag	Ag (% m/m)	Espessura ( $\mu\text{m}$ )
CH	---	---	$10,9 \pm 4,1$
CH/AgC	Citrato	0,470	$10,5 \pm 3,1$
CH/AgC2		1,10	$10,1 \pm 3,0$
CH/AgC5		2,58	$9,5 \pm 2,9$
CH/AgC10		3,94	$10,4 \pm 3,2$
CH/AgB	Borohidreto	0,153	$11,4 \pm 3,0$
CH/AgB2		0,306	$10,4 \pm 2,5$
CH/AgB5		0,798	$9,5 \pm 2,8$
CH/AgB10		1,32	$11,7 \pm 3,1$
HTCCH	---	---	$11,0 \pm 2,3$
HTCCH/AgC	Citrato	0,602	$14,0 \pm 5,1$
DCH	---	---	*
DCH/AgC	Citrato	0,562	*

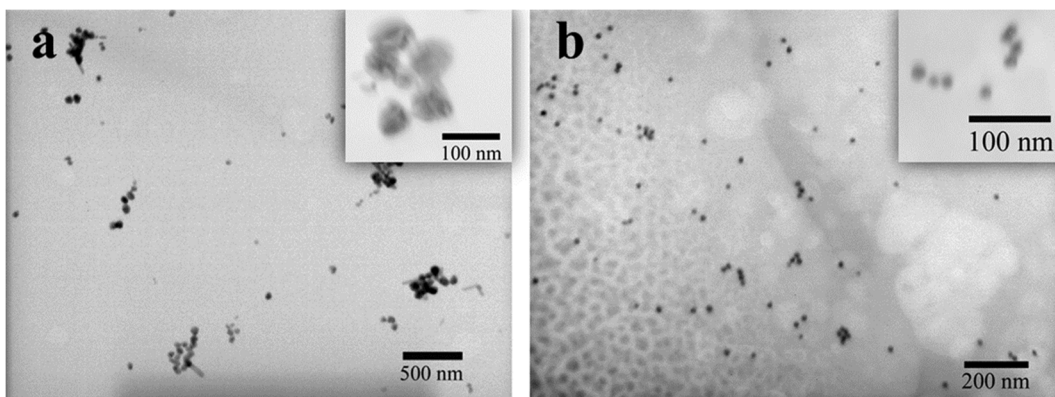
\* Amostras impróprias para medição de espessura.

O teor de Ag nos filmes foi ajustado através da variação da concentração de coloides de Ag a usar na mistura das soluções com os biopolímeros. Os coloides de Ag foram previamente preparados através de dois métodos distintos, nomeadamente pelo método de Creighton [33] (redução do sal de Ag com borohidreto de sódio) e pelo método de Lee-Meisel [34] (redução do sal de Ag com citrato de sódio).

Estes métodos originaram NPs de Ag com duas distribuições de tamanho distinto. No caso da redução com borohidreto foram obtidas NPs de Ag com um diâmetro médio de  $7,1 \pm 1,2$  nm enquanto na redução com citrato o diâmetro obtido foi de  $53 \pm 34$  nm. Nestas condições, o método de redução com citrato leva à obtenção de uma amostra mais polidispersa quando comparada com a obtida pela redução com borohidreto, estando esta observação de acordo com o descrito na literatura [35]. Apesar deste facto, em ambos os casos, os coloides são facilmente dispersos na solução de quitosano e dos respectivos derivados.



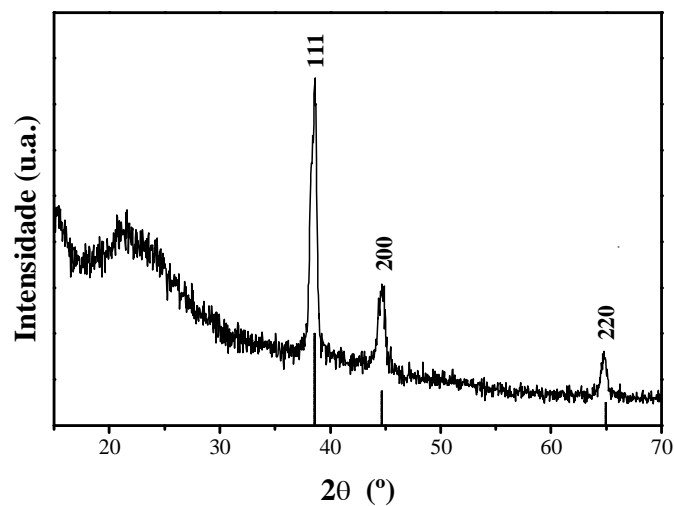
A Figura 3.3 mostra as imagens de TEM dos nanocompósitos quitosano/Ag observando-se que as NPs de Ag nos filmes obtidos apresentam o mesmo tamanho verificado na solução inicial dos coloides. Esta observação mostra que as moléculas de quitosano interagem com a superfície das NPs de Ag promovendo a sua dispersão sem causar modificações significativas nas propriedades morfológicas das partículas. No entanto, como será discutido mais adiante, o aumento do teor de Ag tem efeito na dispersão das NPs nos nanocompósitos levando ao aparecimento de aglomerados.



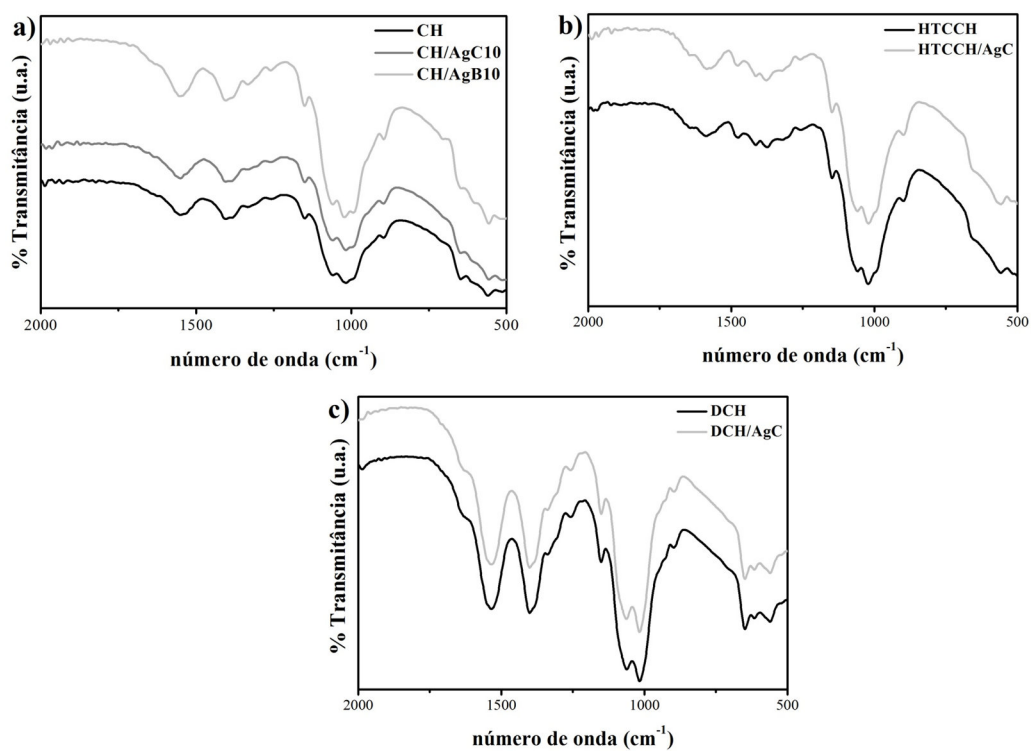
**Figura 3.3** – Imagens de TEM dos nanocompósitos quitosano/Ag: CH/AgC (a) e CH/AgB (b).

A presença de Ag metálica nos nanocompósitos foi confirmada por XRD. A Figura 3.4 mostra o difratograma característico dos nanocompósitos obtidos observando-se as difrações a  $2\theta = 38,58^\circ$  (111),  $44,68^\circ$  (200) e  $64,93^\circ$  (220) atribuídas a prata metálica, com estrutura cúbica de faces centradas [36].

Tal como esperado a incorporação das NPs de Ag no quitosano e derivados não altera a fase cristalina de Ag em relação às NPs individualizadas, estando de acordo com o descrito para sistemas semelhantes com quitosano e NPs de Ag comerciais [21]. Através da análise dos espectros de FTIR dos filmes (Figura 3.5), verificou-se que as matrizes usadas para a preparação dos nanocompósitos mantêm a sua identidade química após processamento em filmes. Os espectros de FTIR das matrizes são praticamente idênticos aos obtidos para os respectivos nanocompósitos com Ag. Este facto encontra-se de acordo com o descrito na literatura para nanocompósitos CH/Ag e é explicado pelas fracas interações entre as NPs de Ag e as cadeias de quitosano [37].

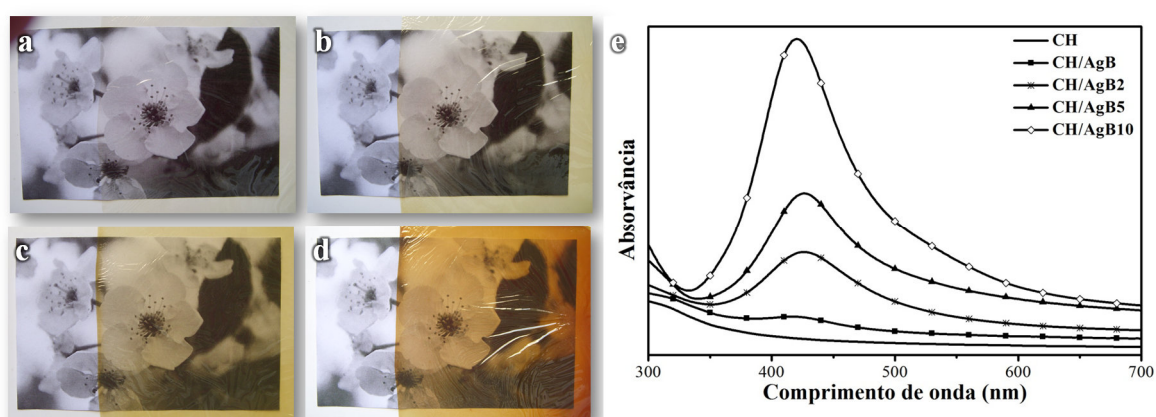


**Figura 3.4** – Difratoograma de raios X do nanocompósito CH/AgC10.

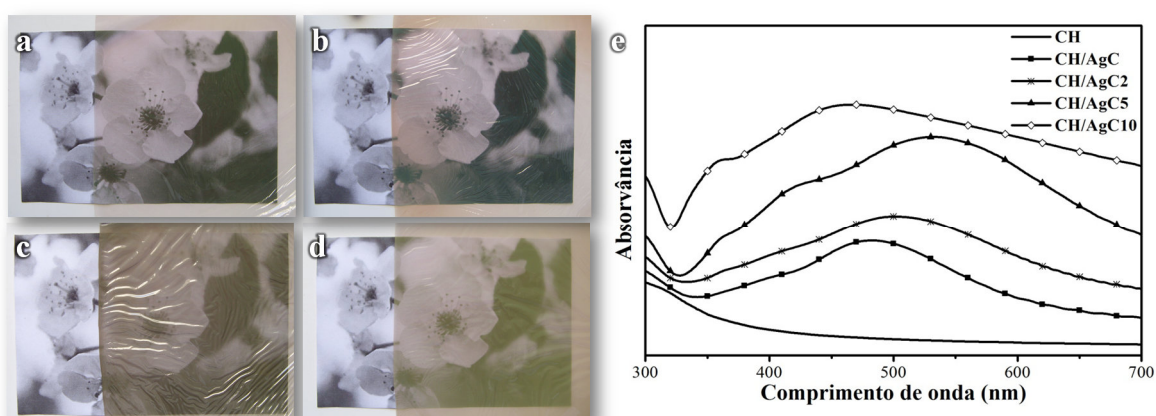


**Figura 3.5** – Espectros de FTIR do CH e nanocompósitos CH/Ag (a), HTCCH e respetivo nanocompósito com Ag (b) e DCH e respetivo nanocompósito com Ag (c).

A dispersão das NPs de Ag nas matrizes de quitosano dá origem a filmes macroscopicamente homogêneos com transparência variável em função do teor de Ag e do tamanho médio de partícula (Figura 3.6 e Figura 3.7). Os filmes apresentam uma forte banda de absorção na região do visível devido à banda de SPR característica das NPs de Ag. Esta banda tem um máximo de absorção entre os 400 e 500 nm, dependendo da metodologia usada na síntese das NPs e do teor de Ag nos filmes, aumentando de intensidade à medida que se aumenta o teor de Ag nos nanocompósitos [38]. O uso dos dois derivados de quitosano para a preparação dos nanocompósitos não alterou as propriedades óticas dos filmes quando comparados com os nanocompósitos análogos com quitosano não modificado.



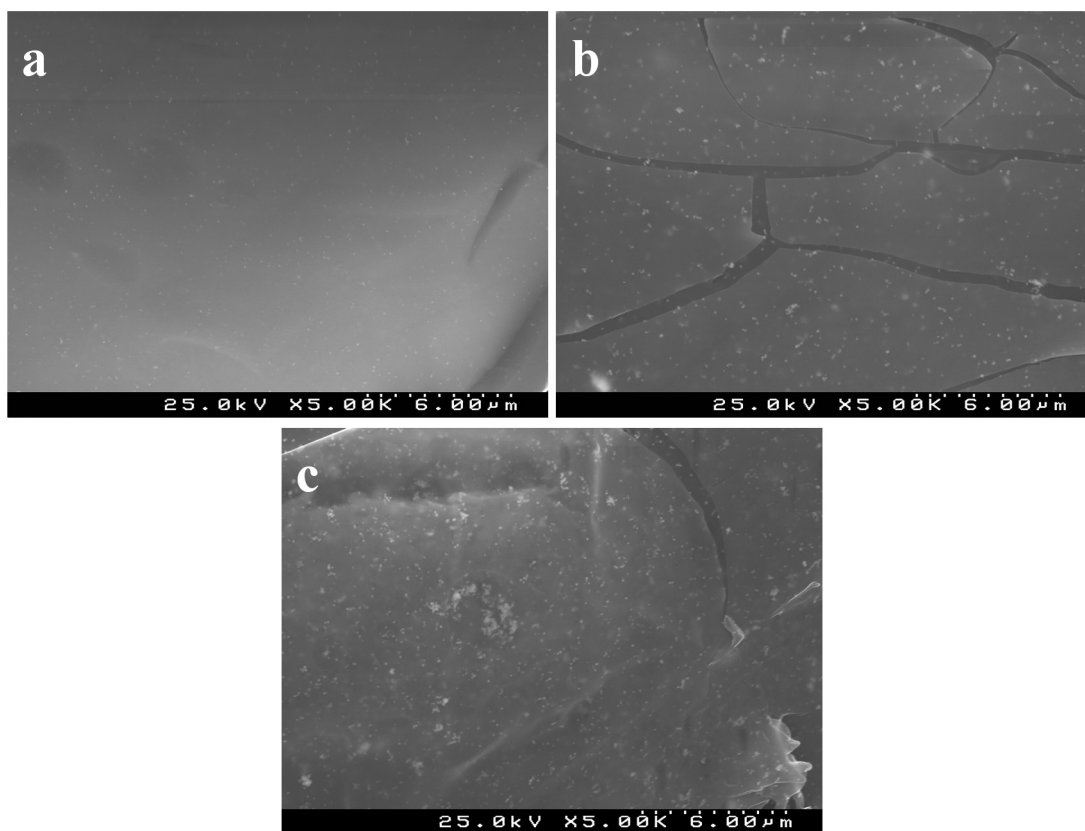
**Figura 3.6** – Fotografias digitais dos nanocompósitos CH/Ag (redução da prata pelo método do borohidreto): CH/AgB (a), CH/AgB2 (b), CH/AgB5 (c), CH/AgB10 (d) e respectivos espectros óticos (e).



**Figura 3.7** – Fotografias digitais dos nanocompósitos CH/Ag (redução da prata pelo método do citrato): CH/AgC (a), CH/AgC2 (b), CH/AgC5 (c), CH/AgC10 (d) e respectivos espectros óticos (e).

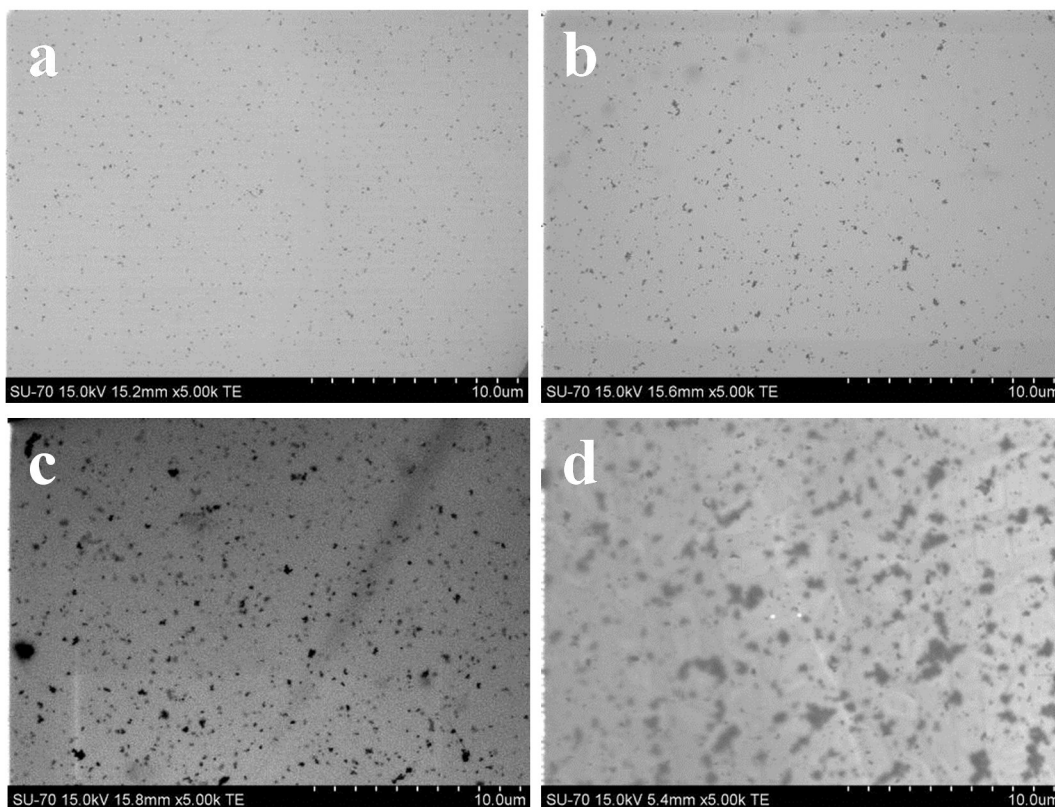
Nos filmes sintetizados com NPs de Ag preparadas pelo método do citrato (Figura 3.7), a banda de absorção é bastante larga o que se deve à distribuição de tamanho das partículas ser maior [35]. Como se pode observar pelas fotografias, estes nanocompósitos mostram uma clara diminuição de transparência ótica quando se aumenta o teor de Ag, não sendo a espessura dos filmes uma justificação para esta observação pois é da mesma ordem de magnitude (Tabela 3.1). Este facto poderá ser explicado pelo maior número de NPs de Ag e eventual aglomeração, que no caso das NPs de Ag preparadas pelo método do citrato é maior. Para confirmar esta hipótese fez-se a análise por microscopia dos filmes preparados.

A Figura 3.8 mostra as imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) dos nanocompósitos CH/AgC. Observou-se que o aumento do teor de Ag nos nanocompósitos provoca o aumento da quantidade de NPs e de aglomerados na superfície dos filmes. Este facto confirma a hipótese colocada relativamente à diminuição da transparência ótica assim como os desvios verificados nos espectros óticos destes filmes. No entanto é visível que a análise de SEM acaba por deteriorar as amostras quando expostas ao feixe de eletrões, provocando danos nos filmes mesmo a voltagens baixas. Este facto permitiu no entanto evidenciar que não existem NPs de Ag apenas nas superfícies dos filmes mas também no seu interior.



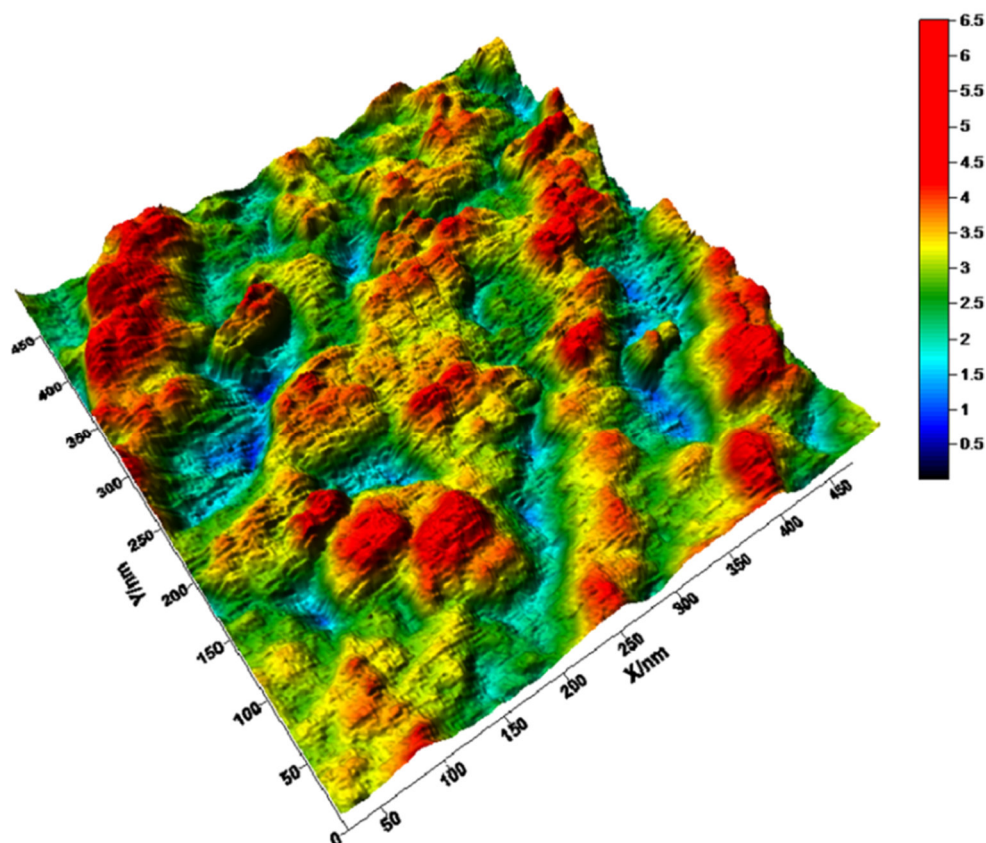
**Figura 3.8** – Imagens de SEM dos filmes: CH/AgC2 (a), CH/AgC5 (b) e CH/AgC10 (c).

Para evitar a deterioração dos filmes recorreu-se à análise por microscopia eletrónica de varrimento com deteção de transmissão (STEM) dos nanocompósitos (Figura 3.9). Através desta análise verificou-se que para os filmes com baixos teores de prata apresentam uma distribuição uniforme das NPs de Ag, no entanto, à medida que se aumenta o teor de Ag, a presença de aglomerados também aumenta. A análise por microscopia de varrimento dos nanocompósitos preparados com NPs de Ag sintetizadas pelo método do borohidreto não permitiu verificar a sua distribuição nos filmes devido ao tamanho bastante reduzido das NPs.



**Figura 3.9** – Imagens de STEM dos filmes nanocompósitos CH/Ag (redução da prata pelo método do citrato) com teores crescentes de Ag (% m/m): 0,470 (a), 1,10 (b), 2,58 (c) e 3,94 (d).

A Figura 3.10 apresenta uma imagem 3D de AFM (topografia) do nanocompósito HTCCH/AgC (NPs de Ag dispersas no derivado de quitosano solúvel em água). A análise de AFM deste nanocompósito confirmou a presença de nanofases metálicas com tamanhos superiores às NPs de Ag presentes no coloide inicial. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por SEM e STEM para filmes com teores de Ag mais elevados, sendo explicado pela aglomeração das NPs na matriz de quitosano.



**Figura 3.10** – Imagem 3D de AFM do nanocompósito preparado com o derivado de quitosano solúvel em água (HTCCH/AgC).

### 3.3 Estudo da atividade antibacteriana dos nanocompósitos quitosano/Ag

A atividade antibacteriana dos nanocompósitos preparados foi testada relativamente a três tipos distintos de bactérias, nomeadamente *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Foi investigado o efeito das modificações químicas da matriz em conjunto com o efeito das NPs de Ag (presença e aumento do seu teor) na atividade antibacteriana dos materiais finais.

A eficiência da inativação das bactérias pelos nanocompósitos foi determinada testando as amostras colocadas em contacto com a suspensão microbiana (após 24 h) e comparando-as com o filme de quitosano puro (CH) e a suspensão líquida microbiana (SLM) sem a presença de amostra. Há SLM foi adicionada uma percentagem do meio de cultura (5%).

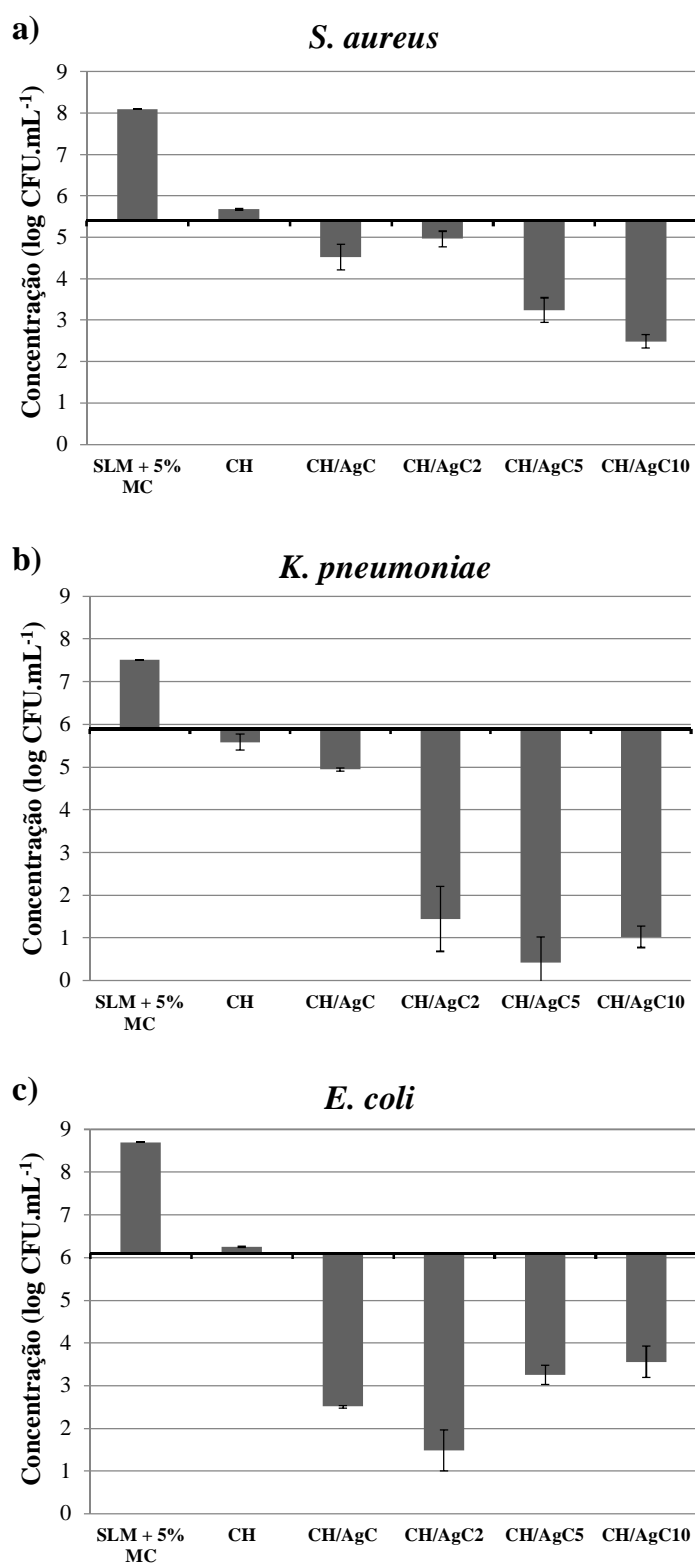
Como evidenciado na Figura 3.11a, a atividade antibacteriana dos nanocompósitos CH/Ag (NPs de Ag preparadas pelo método do citrato) contra o *S. aureus* depende bastante do teor de Ag nos filmes. Os nanocompósitos de quitosano com menor quantidade de Ag (CH/AgC e CH/AgC2) apresentaram efeito bacteriostático (inibição do crescimento de bactérias) mas um efeito



bactericida reduzido. Para esta bactéria verificou-se um elevado efeito bactericida para as amostras com um teor de Ag superior a 1% m/m (CH/AgC5 e CH/AgC10). Apesar de na literatura existirem algumas referências à atividade antimicrobiana dos íons citrato [39], este efeito não foi considerado neste estudo devido à quantidade reduzida de citrato de sódio proveniente da síntese dos colóides de Ag. Apesar deste facto, e para melhor compreensão do efeito do citrato na atividade antibacteriana, foi realizada a análise de nanocompósitos de quitosano com NPs de Au preparadas por redução com o citrato de sódio. A caracterização e respetiva atividade antibacteriana do nanocompósito quitosano/Au serão discutidas no ponto 3.4.

A Figura 3.11b e c mostram a atividade antibacteriana dos filmes compósitos contra *K. pneumoniae* e *E. coli*. Os resultados obtidos para estas bactérias Gram-negativas mostram que, em ambos os casos, ocorre um efeito bactericida mais forte do que o obtido para *S. aureus* (bactéria Gram-positiva). Apesar de neste trabalho a eficiência antibacteriana dos nanocompósitos ser claramente superior em bactérias Gram-negativas, na literatura existe alguma controvérsia. No entanto, a maioria dos trabalhos descritos parece indicar que as bactérias Gram-negativas são mais afetadas que as bactérias Gram-positivas tornando-as mais sensíveis ao quitosano [9], como demonstrado em experiências *in vitro* [40, 41]. Uma explicação é a formação de poros irregulares na membrana exterior das bactérias Gram-negativas devido à interação dos constituintes desta membrana com as NPs de Ag, alterando a sua permeabilidade e causando a libertação de vários elementos celulares. Estas alterações estruturais provocam a degradação desta membrana e finalmente a morte das bactérias [30, 42].

Neste caso é de registar que no caso das bactérias Gram-negativas se obtém um efeito bactericida mais significativo para teores de Ag mais baixos (amostras CH/AgC e CH/AgC2) apesar de distinto para as duas bactérias. No caso da *K. pneumoniae* (Figura 3.11b) ocorre um aumento significativo da atividade antibacteriana da amostra CH/AgC para a CH/AgC2 mantendo-se a eficiência bactericida constante para teores superiores de Ag. Isto indica que para aplicações destes materiais que visem a inibição deste tipo de bactéria teores de Ag à volta de 1% m/m serão suficientes. A *E. coli* apresenta uma eficiência bactericida bastante elevada na amostra com menor teor de Ag (CH/AgC) que acaba por não aumentar proporcionalmente com o teor de Ag (Figura 3.11c).

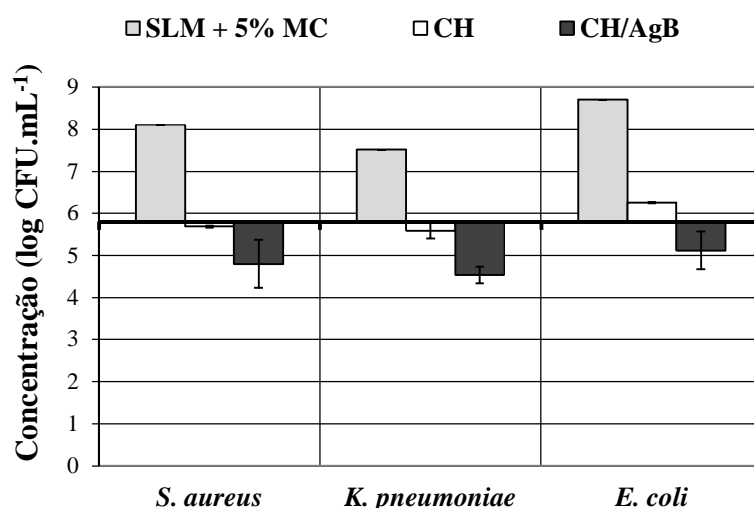


**Figura 3.11** – Atividade antibacteriana do filme de CH e dos nanocompósitos CH/Ag (redução de Ag(I) pelo método do citrato) contra diferentes bactérias: *S. aureus* (a), *K. pneumoniae* (b) e *E. coli* (c). As linhas horizontais pretas indicam a concentração (CFU.mL<sup>-1</sup>) a  $t_0$ .



A amostra controlo contendo apenas o filme de CH sem Ag apresentou um efeito bacteriostático em todas as bactérias usadas neste estudo, encontrando-se de acordo com o descrito previamente na literatura [7, 15, 43]. Estes resultados demonstram que no caso dos nanocompósitos CH/Ag ocorre um efeito duplo em que temos o efeito bactericida das NPs de Ag em conjunto com o efeito catiónico do quitosano. O efeito antibacteriano do quitosano é mais pronunciado pela presença das NPs de Ag como descrito na literatura [7, 25] e também é comprovado pelos resultados experimentais aqui obtidos.

A Figura 3.12 apresenta o estudo da atividade antibacteriana do nanocompósito CH/AgB em relação às três espécies de bactérias indicadas. Apesar do filme ser caracterizado por um teor de Ag baixo (0,153% m/m), a sua atividade antibacteriana para *S. aureus* e *K. pneumoniae* é semelhante à exibida pela amostra CH/AgC, que possui um teor de Ag aproximadamente 3 vezes superior (0,470% m/m) (Figura 3.11a e b). A maior atividade relativa das NPs de Ag preparadas pelo método do borohidreto (amostra CH/AgB), quando comparada com as NPs de Ag preparadas pelo método do citrato (CH/AgC) poderá dever-se à maior área superficial disponível para a interação com as bactérias [28, 44]. A área superficial calculada, considerando a mesma concentração de Ag e forma de partícula esférica com superfície lisa, foi de 82 m<sup>2</sup>/g para as NPs de Ag com 7 nm enquanto para as NPs com 53 nm foi de 11 m<sup>2</sup>/g. Apesar de ser consensual que a diminuição do tamanho leva ao aumento da área superficial, normalmente é referido que os valores calculados são superiores aos verificados experimentalmente [45, 46]. A justificação dada por estes autores é que as NPs de Ag têm uma energia superficial elevada e, durante o processo de desgaseificação, pode ocorrer a coalescência das NPs formando-se aglomerados.



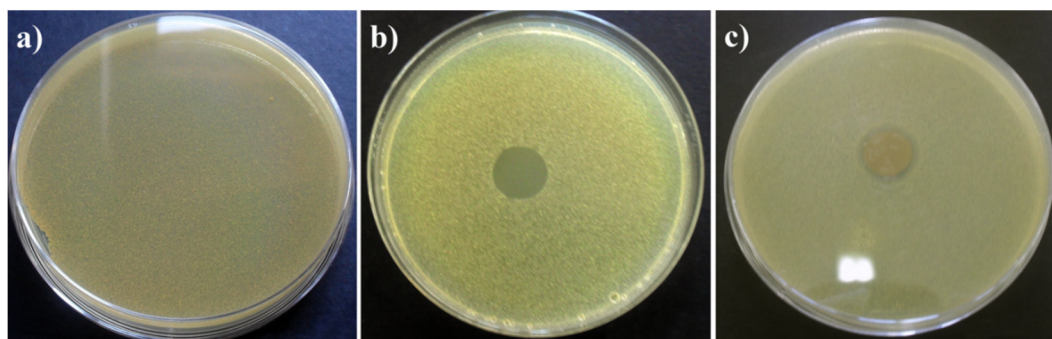
**Figura 3.12** – Atividade antibacteriana do filme CH/AgB contra *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. A linha horizontal preta indica a concentração (CFU.mL<sup>-1</sup>) a t<sub>0</sub>.

Outra justificação é que as NPs de menor tamanho podem interatuar com a membrana das bactérias mas também penetrar no interior das bactérias provocando a sua morte [47].

A atividade antibacteriana destes materiais foi comprovada pelo teste de halo à inibição da *S. aureus* (Tabela 3.2 e Figura 3.13). Como se pode observar, o filme de quitosano sem Ag (CH) e os nanocompósitos CH/Ag testados, mostraram inibição do crescimento de bactérias por baixo das amostras colocadas nas placas de agar inoculadas com o *S. aureus* (Figura 3.13b). Observou-se claramente halos de inibição à volta das amostras caracterizadas por teores de Ag superiores a 1% (CH/AgC2, CH/AgC5 e CH/AgC10). A zona de inibição aumenta com o aumento do teor de Ag, mostrando que existe uma relação direta entre o teor de Ag e o halo de inibição verificado no teste para esta bactéria. Esta zona de inibição não é observada nas amostras caracterizadas por teores de Ag baixos (CH/AgC e CH/AgB) podendo dever-se à difusão limitada de iões  $\text{Ag}^+$  nestas duas amostras, restringindo assim a inibição a áreas mais próximas das amostras. Estes resultados atestam a atividade antibacteriana a nível da inibição do *S. aureus* mostrada na Figura 3.11a e da Figura 3.12.

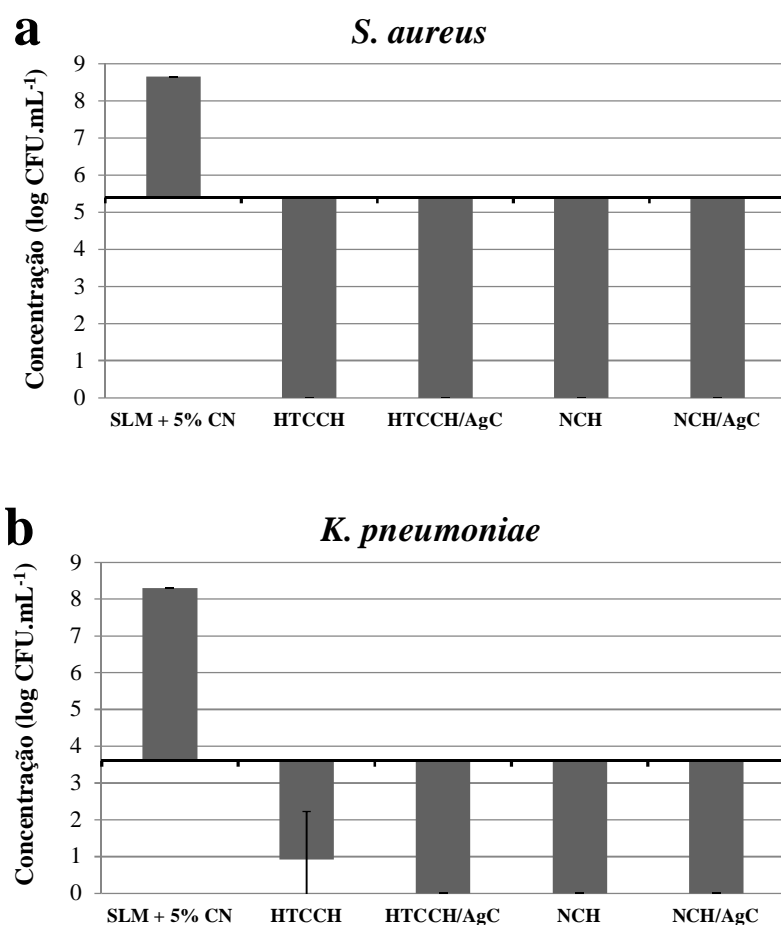
**Tabela 3.2** – Teste de halo. Inibição da *S. aureus* pelo filme de CH e nanocompósitos CH/Ag.

<i>Amostra</i>	<b>Presença de halo à volta da amostra do nanocompósito</b>	<b>Crescimento de bactérias por baixo da amostra</b>
<b>CH</b>	Não	Não
<b>CH/AgC</b>	Não	Não
<b>CH/AgC2</b>	Sim (1,5 mm)	Não
<b>CH/AgC5</b>	Sim (1,7 mm)	Não
<b>CH/AgC10</b>	Sim (2,0 mm)	Não
<b>CH/AgB</b>	Não	Não



**Figura 3.13** – Fotografias digitais dos halos de inibição nas placas de agar inoculadas com *S. aureus* após incubação: ausência de nanocompósito (a), presença do nanocompósito CH/AgC (b; a amostra foi retirada) e presença do nanocompósito CH/AgC5 (c; amostra não retirada).

A atividade antibacteriana dos nanocompósitos de Ag preparados com os derivados modificados quimicamente (HTCCH/AgC e DCH/AgC) foi testada contra a *S. aureus* e *K. pneumoniae* (Figura 3.14). Os resultados foram comparados com os obtidos para os filmes de controlo destes derivados. Foi verificada atividade bactericida elevada (morte de todas as bactérias) para todos os nanocompósitos assim como para os filmes de controlo. Devido a este facto não foi possível comparar as modificações químicas na matriz de quitosano assim como a introdução de NPs de Ag nestes derivados. No entanto observou-se que estes nanocompósitos apresentam uma eficiência antibacteriana muito superior aos preparados com o quitosano não modificado.



**Figura 3.14** – Atividade antibacteriana dos nanocompósitos de CH modificado/Ag contra *S. aureus* (a) e *K. pneumoniae* (b). A linha horizontal preta indica a concentração (CFU.mL<sup>-1</sup>) a  $t_0$ .

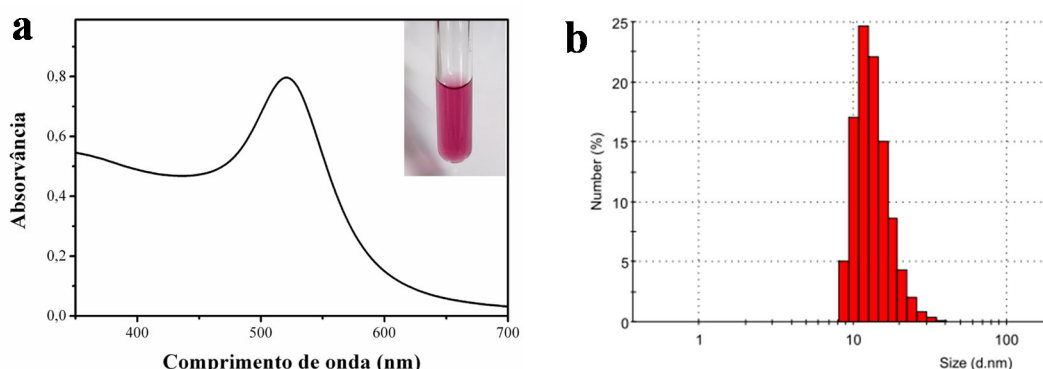
Esta forte atividade antibacteriana era esperada e poderá ser resultado da modificação química da matriz de quitosano com estes grupos específicos. Como descrito em alguns trabalhos [9, 48-51] os sais de amónio quarternários de quitosano apresentam atividade antimicrobiana superior ao quitosano não modificado. Jia *et al.*[50] tenta explicar este facto pelo

aumento de cargas catiónicas no caso dos sais quaternários enquanto Xie *et al.* [51] indica que nos derivados ocorre a formação de micro-áreas hidrofóbicas, devido às ligações por ponte de hidrogénio inter e intramoleculares, resultando na origem de partes hidrofóbicas e hidrofílicas que favorecem a afinidade estrutural entre os derivados e a parede celular das bactérias [9, 43, 52].

A presença de grupos alquilo também desempenha um papel importante na atividade antimicrobiana dos derivados de quitosano. Geralmente o aumento do número destes grupos assim como o comprimento da cadeia carbonada do substituinte aumenta a sua atividade. A melhor eficiência bactericida é explicada pela contribuição das frações hidrofóbicas destes derivados [7, 9, 53].

### 3.4. Nanocompósitos quitosano/Au

De modo a testar comparativamente outro tipo de NPs metálicas na preparação de nanocompósitos com quitosano, foram preparados filmes compósitos usando NPs de Au. Foram escolhidas as NPs de Au pois apresentam tamanho e forma semelhante, quando usado o método de síntese idêntico ao das NPs de Ag. As NPs de Au foram obtidas através da redução, em meio aquoso, do complexo  $[\text{AuCl}_4]^-$  por ação dos iões citrato [54]. Este método deu origem a uma solução coloidal avermelhada que apresenta uma banda de absorção típica com máximo a 520 nm, indicativa da formação de NPs de Au (Figura 3.15a) [55]. O tamanho médio das NPs obtido por DLS foi de  $14 \pm 4$  nm (Figura 3.15b).

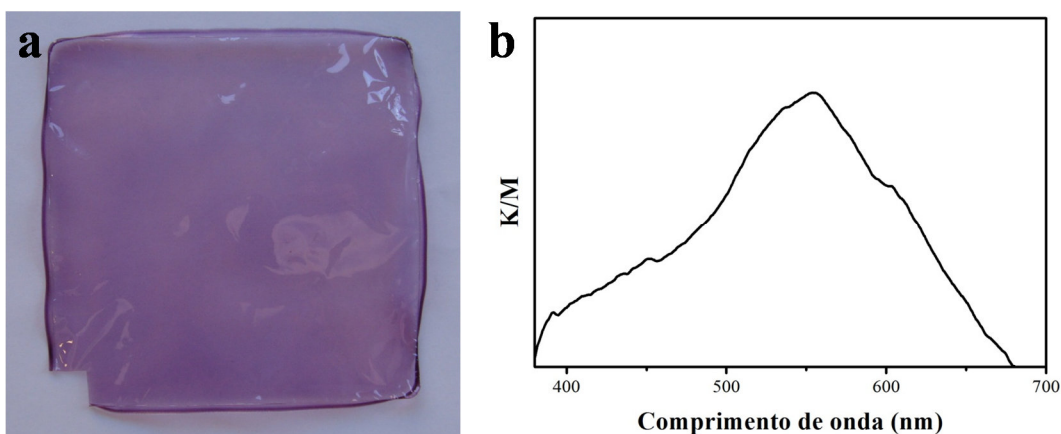


**Figura 3.15** – Espectro ótico do coloide de Au e correspondente fotografia digital (a) e distribuição de tamanhos das NPs de Au, em água, obtida por DLS (b).

A preparação dos nanocompósitos quitosano/Au foi realizada do mesmo modo que o descrito para os filmes análogos com NPs de Ag, ou seja, pela mistura em meio aquoso do quitosano com o coloide de Au. Também neste caso foram obtidos materiais finais na forma de

filmes compactos caracterizados por uma cor idêntica aos coloides iniciais de Au. A Figura 3.16 mostra a fotografia digital do filme de quitosano/Au obtido e respectivo espectro ótico. No caso do nanocompósito observa-se uma banda de absorção na região do visível, devido à banda de SPR das NPs de Au, com um máximo de absorção a 554 nm.

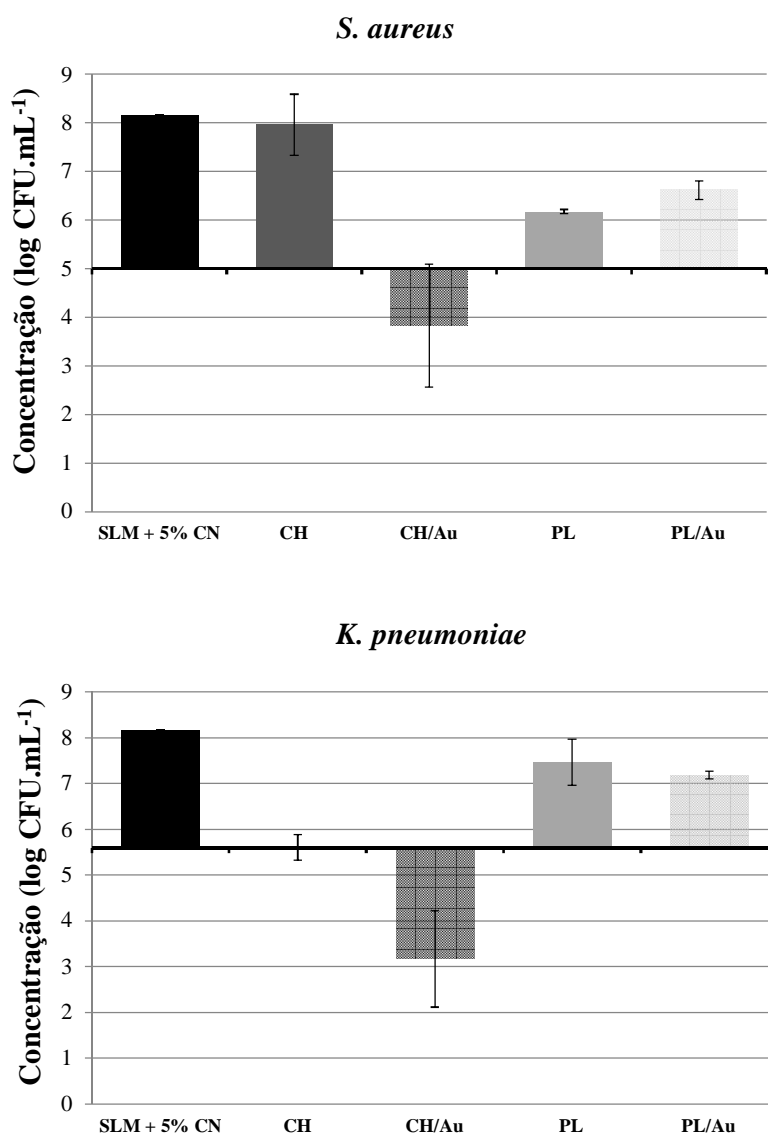
Como verificado nos filmes análogos com Ag preparada por redução com citrato, observou-se o alargamento da banda de absorção devida ao plasmão de superfície das NPs de Au assim como o deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda superiores. Este comportamento observado em nanocompósitos celulose/Au [56], celulose/Ag [27] e celulose/Cu [57] pode dever-se a alterações na função dielétrica do meio circundante (mudança de água para celulose) e/ou acoplamento plasmônico devido à maior proximidade entre as NPs na matriz [58]. Outra explicação para este fenómeno pode dever-se à obtenção dos espectros dos nanocompósitos em modo de refletância difusa enquanto nos coloides é em modo de absorção. O alargamento da banda de SPR observado nos nanocompósitos pode dever-se à maior proximidade das NPs no filme de quitosano.



**Figura 3.16** – Fotografia digital do filme CH/Au (a) e respectivo espectro ótico (b).

A Figura 3.17 mostra os resultados obtidos para a atividade antibacteriana contra a *S. aureus* e *K. pneumoniae* de filmes de quitosano, pululano e respectivos nanocompósitos com Au. Os resultados obtidos mostraram que apenas o nanocompósito CH/Au apresenta atividade antibacteriana contra ambas as espécies de bactérias, no entanto no caso da *K. pneumoniae*, o próprio filme padrão de CH já apresenta atividade. Este resultado era esperado devido ao conhecido efeito antibacteriano do quitosano, contrariamente ao que se verifica no pululano, não sendo, por isso, de estranhar que o filme pululano/Au não apresente diferenças em relação à respetiva amostra de controlo (PL). Para a *S. aureus* observou-se mesmo um aumento, apesar de ligeiro, do log CFU T<sub>24</sub> do nanocompósito em relação ao PL. Este teste com o filme PL/Au

permitiu também verificar que a presença dos iões citrato nas NPs de Au não influencia a atividade antibacteriana.



**Figura 3.17** – Atividade antibacteriana das amostras de controlo, quitosano (CH) e pululano (PL) e dos nanocompósitos com NPs de Au contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

No nanocompósito CH/Au observou-se um aumento significativo da atividade antibacteriana em comparação com o respetivo filme controle de PL. Este facto mostra que a presença de NPs de Au no filme de quitosano tem influência na atividade antibacteriana destes materiais. Este resultado não era esperado pois os trabalhos publicados mostram que as NPs de Au isoladas não afetam o crescimento de bactérias [59], existindo apenas referência à atividade antibacteriana através da

conjugação com NPs de Ag [60] ou funcionalização com distintos compostos químicos (tióis [61], polieletrólitos [62]), antibióticos ou anticorpos [63, 64]. No entanto, mesmo a melhoria da atividade antibacteriana de antibióticos através da conjugação com as NPs de Au é controversa pois, como referido em alguns artigos, a conjugação provoca a agregação dificultando a sua ação [65]. Efetivamente as referências à atividade antibacteriana de NPs de Au isoladas são recentes e muito limitadas [66, 67]. O mecanismo de ação antibacteriano proposto para as NPs de Au é idêntico ao descrito para as NPs de Ag, nomeadamente no que diz respeito à ligação às membranas celulares alterando a permeabilidade e a respiração das bactérias [66].

O estudo agora realizado sugere um aumento da atividade antibacteriana, nomeadamente para a *S. aureus*, quando se passa do filme só com CH para o nanocompósito CH/Au. Zhao *et al.* [68] demonstrou que NPs de Au revestidas com pirimidinas substituídas apresentam atividade antibacteriana, sendo que estas moléculas isoladas não apresentam atividade.

Apesar do quitosano apresentar, só por si, atividade antibacteriana não é de excluir a possibilidade que exista um efeito sinérgico das NPs de Au e o biopolímero. Este resultado vem suportar a ideia de que os mecanismos de ação antimicrobiana das NPs metálicas ainda não se encontram bem conhecidos, sendo necessários estudos adicionais.

### 3.5. Conclusões

Neste trabalho foram preparados diversos nanocompósitos CH/Ag por mistura homogênea de quitosano (modificado e não modificado) com NPs de Ag previamente sintetizadas por métodos distintos: redução do sal de Ag(I) com borohidreto de sódio e redução com citrato de sódio.

Os nanocompósitos preparados apresentam uma distribuição homogênea das NPs de Ag no filme, no entanto, à medida que se aumenta o teor de Ag, estas têm tendência a aglomerar aumentando a opacidade dos filmes. As propriedades óticas dos filmes são dependentes do teor de Ag nos nanocompósitos assim como da metodologia utilizada na síntese das NPs de Ag devido à distribuição de tamanho de partícula presente. Apesar destas diferenças a nível ótico, os resultados obtidos neste trabalho, também distinguem uma relação entre a metodologia de síntese das NPs de Ag e a atividade antibacteriana dos nanocompósitos. Verificou-se que, para teores de Ag semelhantes, os materiais preparados com NPs sintetizadas pelo método do borohidreto apresentaram uma atividade antibacteriana mais eficiente.

Os materiais preparados mostraram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) assim como Gram-negativas (*K. pneumoniae* e *E. coli*). Os testes realizados nos nanocompósitos CH/Ag (NPs de Ag preparadas pelo método do citrato) evidenciaram que a inibição no crescimento de bactérias é afetada pelo teor de Ag. Geralmente o efeito antibacteriano aumenta com o teor de Ag nos nanocompósitos (inibição do crescimento para baixos teores de Ag e efeito bactericida significativo para teores elevados), no entanto o efeito é dependente do tipo de bactéria usada.

Foi confirmado que filmes de quitosano sem NPs de Ag apresentam atividade antibacteriana. A comparação entre as diversas matrizes e nanocompósitos (preparados com o CH e derivados modificados quimicamente) mostrou uma atividade bactericida bastante elevada no caso dos filmes preparados com os derivados modificados de CH. Para as mesmas condições de ensaio, tanto para a *S. aureus* como para a *K. pneumoniae*, verificou-se a inativação de todas as bactérias inoculadas até ao limite de deteção do método.

Os nanocompósitos CH/Au também apresentam atividade antibacteriana contra ambas espécies de bactérias podendo este efeito dever-se a um efeito sinérgico das NPs de Au com o biopolímero. Estes aspetos irão sem dúvida contribuir para estabelecer uma plataforma que permitirá o desenvolvimento de nanocompósitos à base de quitosano nos quais tanto as propriedades óticas como antibacterianas poderão ser ajustadas em função da aplicação prevista. A aplicação deste tipo de estruturas poderá ter relevância em materiais com aplicações específicas em ambiente hospitalar ou em materiais de embalagem especiais.



### 3.6. Referências

- [1] Alves NM, Mano JF. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008** 43, 401-414.
- [2] Duarte ML, Ferreira MC, Marvao MR, Rocha J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002** 31, 1-8.
- [3] Belgacem MN, Gandini A. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources. 1<sup>st</sup> ed. London: Elsevier; **2008**.
- [4] Kurita K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.* **2006** 8, 203-226.
- [5] Fernandes SCM, Oliveira L, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP, Gandini A, et al. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chem.* **2009** 11, 2023-2029.
- [6] Huang HZ, Yuan Q, Yang XR. Preparation and characterization of metal-chitosan nanocomposites. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2004** 39, 31-37.
- [7] Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* **2003** 4, 1457-1465.
- [8] Aranaz I, Harris R, Heras A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. *Curr. Org. Chem.* **2010** 14, 308-330.
- [9] Goy RC, de Britto D, Assis OBG. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polimeros* **2009** 19, 241-247.
- [10] Zhang C, Ding Y, Yu L, Ping Q. Polymeric micelle systems of hydroxycamptothecin based on amphiphilic N-alkyl-N-trimethyl chitosan derivatives. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2007** 55, 192-199.
- [11] Lu G, Kong L, Sheng B, Wang G, Gong Y, Zhang X. Degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan and its potential application for peripheral nerve regeneration. *Eur. Polym. J.* **2007** 43, 3807-3818.
- [12] Dias CI, Mano JF, Alves NM. PH-Responsive biomineralization onto chitosan grafted biodegradable substrates. *J. Mater. Chem.* **2008** 18, 2493-2499.
- [13] Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Dubovik AS, Grinberg NV, Burova TV, Grinberg VY. Temperature-sensitive chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties. *J. Control. Release* **2005** 102, 629-641.
- [14] Bhattarai N, Ramay HR, Gunn J, Matsen FA, Zhang MQ. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *J. Control. Release* **2005** 103, 609-624.

- [15] Muzzarelli R, Muzzarelli C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. In: Heinze T, editor. Polysaccharides I: Springer Berlin / Heidelberg; **2005**. p. 151-209.
- [16] Xu T, Xin M, Li M, Huang H, Zhou S, Liu J. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan. *Carbohydr. Res.* **2011** 346, 2445-2450.
- [17] Roller S, Covill N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* **1999** 47, 67-77.
- [18] Sebti I, Martial-Gros A, Carnet-Pantiez A, Grelier S, Coma V. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *J. Food Sci.* **2005** 70, M100-M104.
- [19] Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* **1999** 62, 239-243.
- [20] Wei DW, Ye YZ, Jia XP, Yuan C, Qian WP. Chitosan as an active support for assembly of metal nanoparticles and application of the resultant bioconjugates in catalysis. *Carbohydr. Res.* **2010** 345, 74-81.
- [21] Rhim JW, Hong SI, Park HM, Ng PKW. Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006** 54, 5814-5822.
- [22] Travan A, Pelillo C, Donati I, Marsich E, Benincasa M, Scarpa T, et al. Non-cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules* **2009** 10, 1429-1435.
- [23] Huang HZ, Yang XR. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydr. Res.* **2004** 339, 2627-2631.
- [24] Hortigueela MJ, Aranaz I, Gutierrez MC, Luisa Ferrer M, del Monte F. Chitosan Gelation Induced by the in Situ Formation of Gold Nanoparticles and Its Processing into Macroporous Scaffolds. *Biomacromolecules* **2011** 12, 179-186.
- [25] Wei DW, Sun WY, Qian WP, Ye YZ, Ma XY. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydr. Res.* **2009** 344, 2375-2382.
- [26] Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* **2008** 24, 2051-2056.
- [27] Pinto RJB, Marques P, Neto CP, Trindade T, Daina S, Sadocco P. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. *Acta Biomater.* **2009** 5, 2279-2289.
- [28] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009** 145, 83-96.

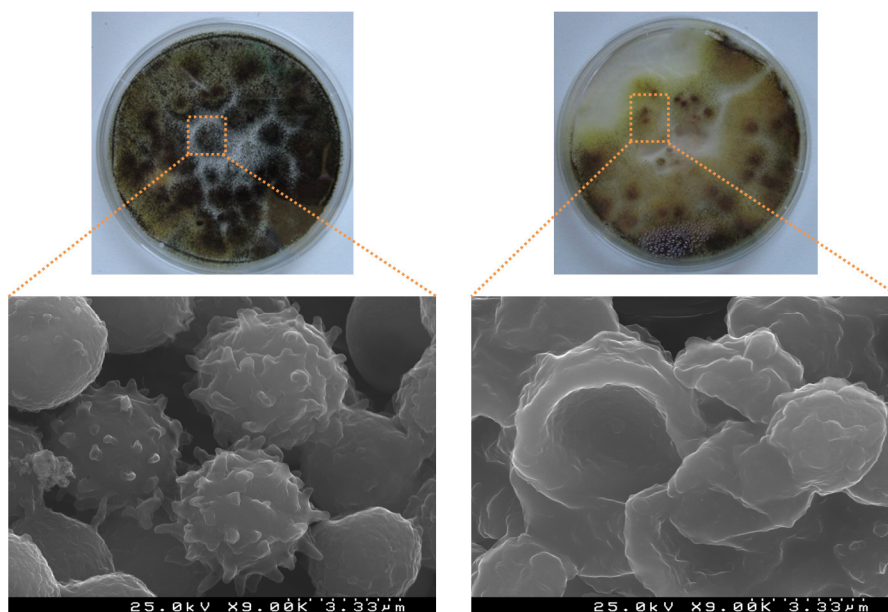
- [29] Vimala K, Mohan YM, Sivudu KS, Varaprasad K, Ravindra S, Reddy NN, et al. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2010** 76, 248-258.
- [30] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2004** 275, 177-182.
- [31] Shi ZL, Neoh KG, Kang ET, Wang W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials* **2006** 27, 2440-2449.
- [32] Madhumathi K, Kumar PTS, Abhilash S, Sreeja V, Tamura H, Manzoor K, et al. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010** 21, 807-813.
- [33] Creighton JA, Blatchford CG, Albrecht MG. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1979** 75, 790-798.
- [34] Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **1982** 86, 3391-3395.
- [35] Pillai ZS, Kamat PV. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *J. Phys. Chem. B* **2004** 108, 945-951.
- [36] Shameli K, Bin Ahmad M, Zargar M, Yunus WMZW, Rustaiyan A, Ibrahim NA. Synthesis of silver nanoparticles in montmorillonite and their antibacterial behavior. *Int. J. Nanomed.* **2011** 6, 581-590.
- [37] Bozanic DK, Trandafilovic LV, Luyt AS, Djokovic V. 'Green' synthesis and optical properties of silver-chitosan complexes and nanocomposites. *React. Funct. Polym.* **2010** 70, 869-873.
- [38] Nogueira HIS, Teixeira-Dias JJC, Trindade T. Nanostructured Metals in Surface Enhanced Raman Spectroscopy. In: Nalwa HS, editor. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* **2004**. p. 699-715.
- [39] Lee YL, Cesario T, Owens J, Shanbrom E, Thrupp LD. Antibacterial activity of citrate and acetate. *Nutrition* **2002** 18, 665-666.
- [40] Helander IM, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2001** 71, 235-244.
- [41] Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Malcata FX. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Ultramicroscopy* **2008** 108, 1128-1134.

- [42] Amro NA, Kotra LP, Wadu-Mesthrige K, Bulychev A, Mobashery S, Liu G-y. High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the Escherichia coli Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir* **2000** 16, 2789-2796.
- [43] Je J-Y, Kim S-K. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *J. Agric. Food Chem.* **2006** 54, 6629-6633.
- [44] Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Prucek R, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* **2008** 112, 5825-5834.
- [45] Wani IA, Khatoon S, Ganguly A, Ahmed J, Ganguli AK, Ahmad T. Silver nanoparticles: Large scale solvothermal synthesis and optical properties. *Mater. Res. Bull.* **2010** 45, 1033-1038.
- [46] Wani IA, Ganguly A, Ahmed J, Ahmad T. Silver nanoparticles: Ultrasonic wave assisted synthesis, optical characterization and surface area studies. *Mater. Lett.* **2011** 65, 520-522.
- [47] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005** 16, 2346-2353.
- [48] Peng ZX, Wang L, Du L, Guo SR, Wang XQ, Tang TT. Adjustment of the antibacterial activity and biocompatibility of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan by varying the degree of substitution of quaternary ammonium. *Carbohydr. Polym.* **2010** 81, 275-283.
- [49] Vallapa N, Wiarachai O, Thongchul N, Pan JS, Tangpasuthadol V, Kiatkamjornwong S, et al. Enhancing antibacterial activity of chitosan surface by heterogeneous quaternization. *Carbohydr. Polym.* **2011** 83, 868-875.
- [50] Jia Z, shen D, Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr. Res.* **2001** 333, 1-6.
- [51] Xie W, Xu P, Wang W, Liu Q. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydr. Polym.* **2002** 50, 35-40.
- [52] Je JY, Kim SK. Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2006** 1760, 104-109.
- [53] Kenawy E-R, Worley SD, Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. *Biomacromolecules* **2007** 8, 1359-1384.
- [54] Enustun BV, Turkevich J. Coagulation of colloidal gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1963** 85, 3317-&.
- [55] Ung T, Liz-Marzan LM, Mulvaney P. Optical properties of thin films of Au@SiO<sub>2</sub> particles. *J. Phys. Chem. B* **2001** 105, 3441-3452.
- [56] Pinto RJB, Marques PAAP, Martins MA, Neto CP, Trindade T. Electrostatic assembly and growth of gold nanoparticles in cellulosic fibres. *J. Colloid Interface Sci.* **2007** 312, 506-512.

- [57] Pinto RJB, Neves MC, Pascoal Neto P, Trindade T. Growth and Chemical Stability of Copper Nanostructures on Cellulosic Fibers. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012** DOI: 10.1002/ejic.201200605.
- [58] Khlebtsov NG, Dykman LA. Plasmonic Nanoparticles: Fabrication, Optical Properties, and Biomedical Applications. In: Tuchin VV, editor. Handbook of Photonics for Biomedical Science. 1 ed: CRC Press; **2010**. p. 37–85.
- [59] Williams DN, Ehrman SH, Pulliam Holoman TR. Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. *J. Nanobiotechnol.* **2006** 4, 3-3.
- [60] Banerjee M, Sharma S, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Enhanced antibacterial activity of bimetallic gold-silver core-shell nanoparticles at low silver concentration. *Nanoscale* **2011** 3, 5120-5125.
- [61] Hayden SC, Zhao G, Saha K, Phillips RL, Li X, Miranda OR, et al. Aggregation and Interaction of Cationic Nanoparticles on Bacterial Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2012** 134, 6920-6923.
- [62] Bunz UHF, Rotello VM. Gold Nanoparticle-Fluorophore Complexes: Sensitive and Discerning "Noses" for Biosystems Sensing. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2010** 49, 3268-3279.
- [63] Huang W-C, Tsai P-J, Chen Y-C. Functional gold nanoparticles as photothermal agents for selective-killing of pathogenic bacteria. *Nanomedicine* **2007** 2, 777-787.
- [64] Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B. Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. *Nano Lett.* **2003** 3, 1261-1263.
- [65] Burygin GL, Khlebtsov BN, Shantrokha AN, Dykman LA, Bogatyrev VA, Khlebtsov NG. On the Enhanced Antibacterial Activity of Antibiotics Mixed with Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2009** 4, 794-801.
- [66] Smitha SL, Gopchandran KG, Nair NR, Nampoothiri KM, Ravindran TR. SERS and Antibacterial Active Green Synthesized Gold Nanoparticles. *Plasmonics* **2012** 7, 515-524.
- [67] Arshi N, Ahmed F, Kumar S, Anwar MS, Lu J, Koo BH, et al. Microwave assisted synthesis of gold nanoparticles and their antibacterial activity against Escherichia coli (E-coli). *Curr. Appl. Phys.* **2011** 11, S360-S363.
- [68] Zhao YY, Tian Y, Cui Y, Liu WW, Ma WS, Jiang XY. Small Molecule-Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents That Target Gram-Negative Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2010** 132, 12349-12356.



## Capítulo 4



### ***ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FILMES DE NANOCOMPÓSITOS DE PULULANO E PRATA COLOIDAL***

Neste capítulo descreve-se a preparação e caracterização de nanocompósitos de pululano à base de prata. O pululano foi usado como matriz para dispersão das NPs de Ag sendo os materiais finais obtidos na forma de filmes. Ao contrário dos capítulos anteriores, os nanocompósitos aqui descritos foram investigados em termos da ação antimicrobiana, no que diz respeito ao seu efeito fungicida. Foi estudado o efeito antifúngico destes materiais contra o *Aspergillus niger* tendo-se realizado uma avaliação da sua atividade antifúngica como material de embalagem de frutos, nomeadamente para morangos.

**CAPÍTULO 4 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE FILMES DE NANOCOMPÓSITOS DE PULULANO E PRATA COLOIDAL**

4.1 Introdução.....	113
4.2 Síntese e caracterização de nanocompósitos pululano/Ag .....	116
4.3 Atividade antifúngica dos filmes de pululano/Ag.....	120
4.4 Avaliação da atividade antifúngica dos nanocompósitos como material de embalagem de frutos.....	126
4.5 Conclusões .....	129
4.6 Referências .....	130



## 4.1 Introdução

A elevada resistência que várias estirpes microbianas têm desenvolvido relativamente a antibióticos comerciais é atualmente uma preocupação, tendo originado um aumento do número de estudos no que diz respeito ao desenvolvimento de materiais antimicrobianos mais eficazes [1-3]. Embora o uso de prata como agente antimicrobiano remonte a muitos anos atrás, tem havido um interesse renovado na sua utilização, nomeadamente através do uso na forma de NPs dispersas. [4, 5].

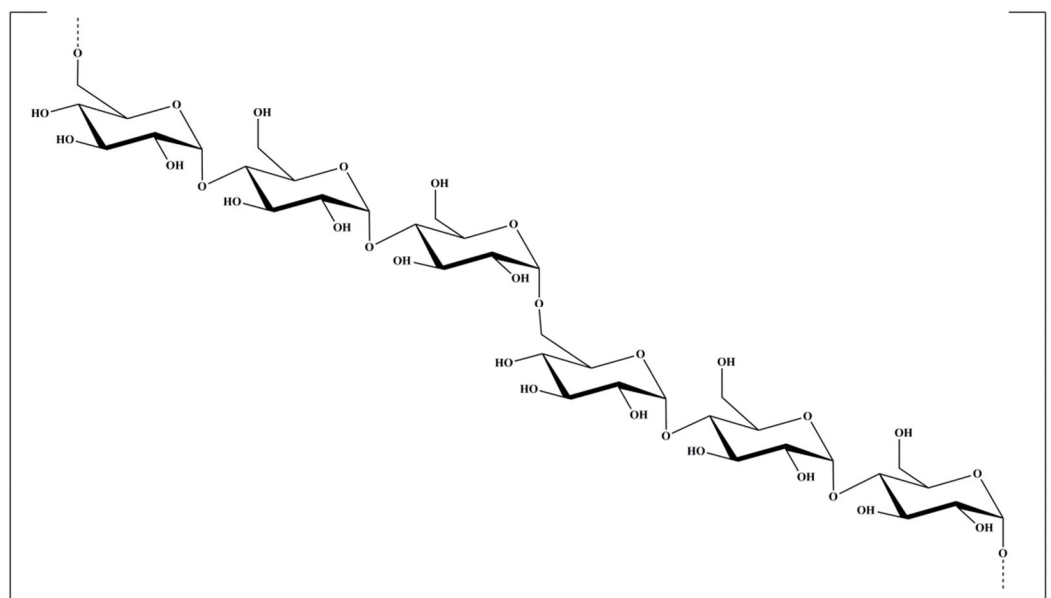
De facto este esforço na procura de novos materiais é demonstrado pelo elevado número de trabalhos publicados descrevendo a preparação de nanocompósitos contendo NPs de Ag, numa variedade de matrizes poliméricas. O uso de polímeros sintéticos como o nylon [6], poliéster [7], poli metacrilato de metilo [8], poli (álcool vinílico) [9] ou copolímeros [10] para este fim é um bom exemplo. Tal como referido no capítulo 1, o uso de biopolímeros tem ganho relevância devido principalmente à sua natureza renovável e possível biocompatibilidade e biodegradabilidade [11, 12]. Nanocompósitos de prata com quitosano [13], celulose [14], amido [15], dextrano [16] e alginato [17] são alguns exemplos já descritos de materiais antimicrobianos baseados em biopolímeros.

No entanto, tanto quanto temos conhecimento, não existem estudos descritos sobre a preparação de nanocompósitos que combinem NPs de Ag e o pululano. Para além deste facto, a maioria dos artigos descritos na temática dos materiais antimicrobianos incide sobre a atividade antibacteriana e não sobre a atividade antifúngica [18-20]. Esta é uma linha de investigação de relevância fundamental no desenvolvimento de novos fungicidas, uma vez que os fungicidas convencionais apresentam uma série de efeitos secundários prejudiciais ao homem além de poderem também ganhar resistência aos antifúngicos [21].

O pululano é um exopolissacarídeo produzido aerobicamente por certas estirpes de fungos polimórficos como o *Aureobasidium pullulan*. Este biopolímero é composto por unidades de maltotriose ligadas através de ligações  $\alpha$ -(1-6) (Figura 4.1) [22].

O pululano é solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos, tendo elevadas propriedades de adesão e capacidade de formação de filmes. As respetivas soluções aquosas são estáveis e têm viscosidade reduzida, quando comparada com outros polissacarídeos. Os filmes de pululano são transparentes, comestíveis, altamente impermeáveis ao oxigénio, biodegradáveis e biocompatíveis para os humanos e para o ambiente. A sua estabilidade térmica e as suas propriedades mecânicas permitem a sua utilização nomeadamente na indústria alimentar e farmacêutica. Alguns exemplos são o seu uso como revestimentos ou materiais de embalagem para

alimentos secos e como revestimentos ou componentes para comprimidos e pílulas [22, 23]. Para além deste aspeto, o pululano pode ser modificado quimicamente [24, 25] ou usado em conjunto com outros polímeros [26], ou mesmo biopolímeros [27, 28], proporcionando novas funcionalidades e aumentando claramente a sua área de aplicabilidade.



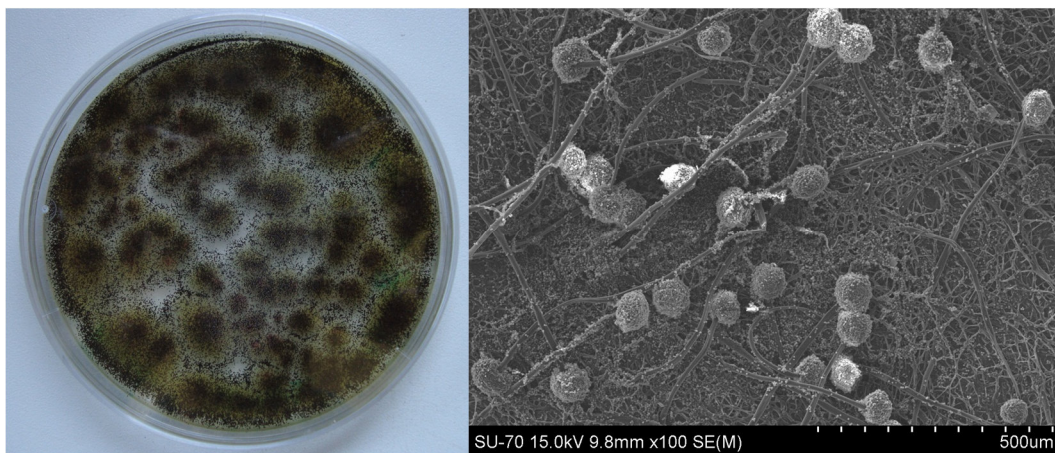
**Figura 4.1** – Estrutura química da unidade básica do pululano.

Seguindo o interesse no desenvolvimento de bionanocompósitos antimicrobianos descritos no capítulo 2 e 3 [29, 30], que poderão ser usados como materiais de embalagem ou no seu revestimento, neste capítulo é descrita a preparação e estudo da atividade antifúngica de filmes transparentes de pululano e NPs de Ag.

A contaminação fúngica representa uma das causas mais comuns para a deterioração de alimentos, portanto os nanocompósitos aqui descritos poderão ter interesse no desenvolvimento de materiais de embalagem testando-se especificamente o *A. niger* pois é um dos contaminantes fúngicos mais comuns em alimentos [31].

O *A. niger* (Figura 4.2) é um dos micro-organismos mais importantes usados em biotecnologia sendo usado há muitos anos para produzir extracelularmente enzimas e ácido cítrico, apesar de atualmente poder ser usado também em tratamento de resíduos [32]. No entanto, este fungo que se reproduz através da formação de conídeos, que são esporos assexuados, provoca uma doença em algumas frutas e legumes chamada de mofo preto sendo caracterizada pelo aparecimento de manchas ou bolor preto. A inativação dos esporos do fungo é um desafio pois estes são protegidos por uma parede celular rígida sendo resistentes à dessecação e podendo

dispersar-se facilmente. Estas características permitem ao *A. niger* sobreviver em condições ambientais adversas, por períodos de tempo longos [33, 34].



**Figura 4.2** – Placa de Petri inoculada com o *A. niger* e correspondente imagem de SEM mostrando as hifas, os conidióforos e os esporos.

Neste trabalho, em particular, foi usado o *A. niger* como modelo de modo a investigar em detalhe o efeito na atividade antifúngica destes materiais nomeadamente na ação inibitória sobre a esporulação. Este estudo poderá ter grande relevância no desenvolvimento de novos bionanocompósitos com potencial aplicação em materiais de embalagem antifúngicos. Para além deste facto, este trabalho também permitirá um aprofundamento do conhecimento relativo a estes materiais assim como aos fenómenos subjacentes à sua atividade fungicida.

Este capítulo encontra-se dividido em três partes. Na primeira parte será apresentada a preparação e caracterização de filmes compósitos de pululano/Ag obtidos através de mistura direta das NPs de Ag com o biopolímero. Na segunda parte será apresentado o estudo da atividade antifúngica dos filmes. Será enfatizado o efeito do teor de Ag nos nanocompósitos e tamanho das partículas (método de síntese das NPs de Ag). Será avaliado, a título de ensaio prático, o efeito deste tipo de materiais sobre as hifas e mais especificamente sobre os esporos de *A. niger*. Na última parte será avaliada a atividade antifúngica dos nanocompósitos como material de embalagem para frutos, testando-se nomeadamente o revestimento de recipientes para embalagem de morangos.

## 4.2 Síntese e caracterização de nanocompósitos pululano/Ag

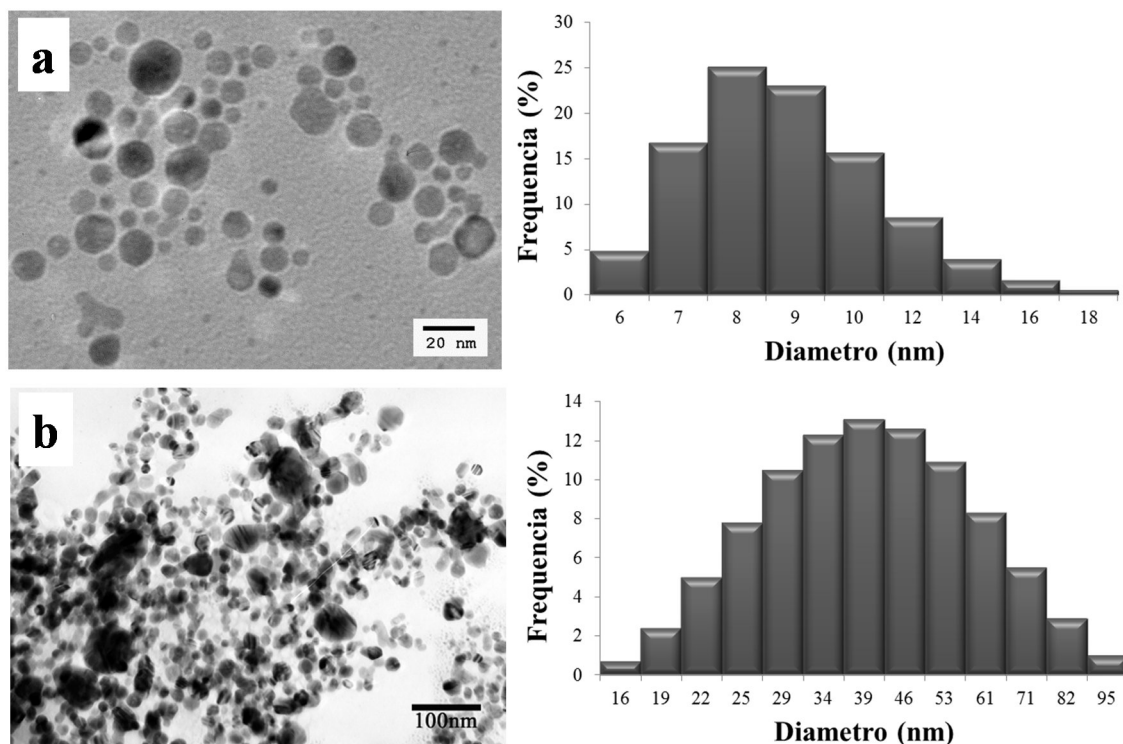
Os nanocompósitos de PL/Ag foram preparados sob a forma de filmes transparentes por evaporação de solvente a partir de misturas de soluções aquosas de PL com NPs de Ag preparadas previamente. De igual modo ao realizado para os nanocompósitos CH/Ag (capítulo 3), as NPs de Ag foram preparadas por dois métodos distintos nomeadamente redução com borohidreto de sódio e citrato de sódio. A Tabela 4.1 apresenta as amostras PL/Ag investigadas neste estudo assim como a espessura dos filmes e respetivo teor de Ag (determinado por ICP). Para fins comparativos foram preparados um filme de controlo só com pululano (PL) e um filme de PL com nitrato de prata, sal usado na síntese das NPs de Ag (PL/Ag<sup>+</sup>).

**Tabela 4.1** – Caracterização do filme de pululano e dos nanocompósitos PL/Ag.

Amostra	Espessura (μm)	Teor de Ag (% m/m)
PL	66,3 ± 4,1	---
PL/Ag <sup>+</sup>	62,6 ± 21,0	0,0628
PL/AgB <sub>1</sub>	67,8 ± 19,5	0,0156
PL/AgB <sub>2</sub>	66,2 ± 4,6	0,0317
PL/AgB <sub>5</sub>	62,2 ± 9,6	0,0803
PL/AgB <sub>10</sub>	74,2 ± 14,4	0,171
PL/AgC <sub>1</sub>	68,3 ± 10,6	0,0466
PL/AgC <sub>2</sub>	69,3 ± 15,8	0,111
PL/AgC <sub>5</sub>	76,4 ± 11,3	0,151
PL/AgC <sub>10</sub>	75,6 ± 9,5	0,241

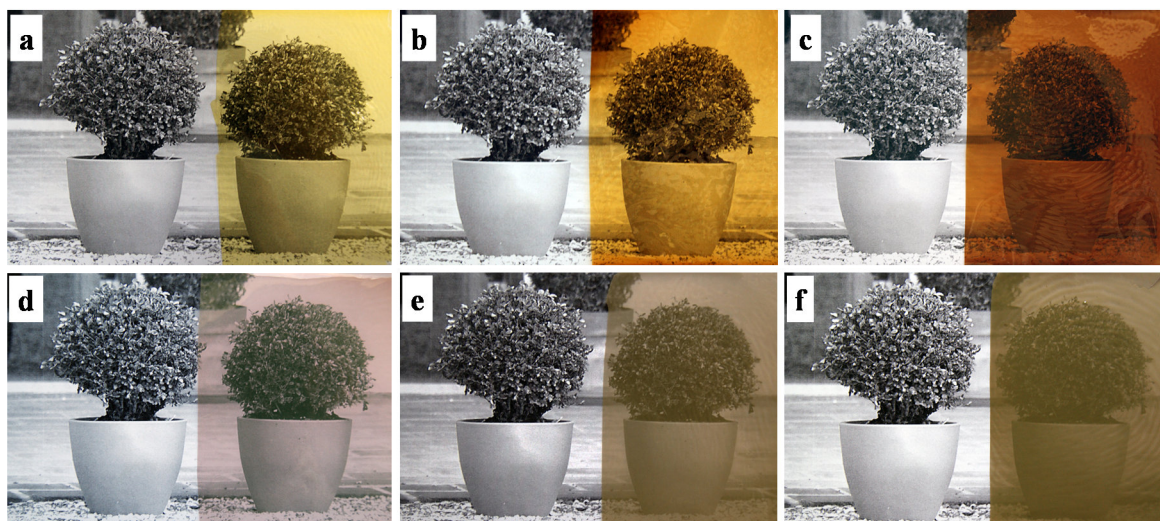
A Figura 4.3 mostra as imagens de TEM e os histogramas com as distribuições de tamanho das NPs de Ag usadas para a preparação dos nanocompósitos. O diâmetro médio das NPs de Ag preparadas por redução com o borohidreto estimado por TEM foi de  $8,6 \pm 2,7$  nm, um valor ligeiramente inferior ao diâmetro hidrodinâmico obtido através da análise de DLS dos coloides ( $8,8 \pm 2,4$  nm). As NPs de Ag preparadas por este método apresentam uma carga superficial negativa ( $\zeta = -19,5$  mV a pH = 7,2) o que contribui para a estabilidade do coloide inicial e permitiu a preparação de misturas aquosas homogêneas com o pululano.

No caso das NPs de Ag preparadas por redução com o citrato de sódio a distribuição de tamanhos é mais dispersa tendo-se obtido por DLS um diâmetro médio de  $44 \pm 25$  nm com um valor de  $\zeta = -35,9 \pm 9,58$  (pH = 7,1). Trata-se efetivamente de uma amostra polidispersa onde efeitos de tamanho de partículas terão de ser analisados criticamente.



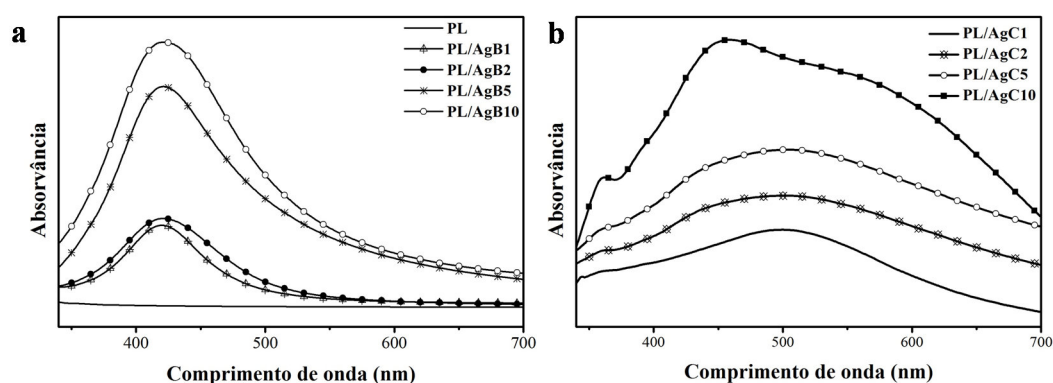
**Figura 4.3** – Imagem de TEM das NPs de Ag sintetizadas e histograma com a respetiva distribuição de tamanhos: redução pelo borohidreto (a) e pelo citrato (b).

A evaporação de água das misturas de pululano/NPs Ag deu origem a filmes transparentes e macroscopicamente homogêneos (Figura 4.4). A observação das fotografias mostrou que os filmes preservam a cor e estabilidade dos coloides de Ag iniciais previsivelmente devido ao impedimento da aglomeração das NPs pelas macromoléculas de pululano. Apesar de opticamente transparentes, todos os filmes exibem um gradiente de cor dependente do método de preparação das NPs de Ag assim como do teor de Ag usado na sua síntese.



**Figura 4.4** – Fotografias digitais dos nanocompósitos de pululano com Ag: PL/AgB2 (a), PL/AgB5 (b), PL/AgB10 (c), PL/AgC1 (d), PL/AgC5 (e) e PL/AgC10 (f).

Uma primeira evidência da boa homogeneidade dos nanocompósitos preparados foi obtida através da análise do espectro ótico (Figura 4.5). Os nanocompósitos PL/AgB apresentam um máximo de absorção à volta dos 420 nm, não se observado um alargamento da banda de SPR das NPs de Ag. Este resultado confirmou que, assim como descrito em diversos trabalhos com NPs de Ag e Au incorporadas em filmes com outros biopolímeros [29, 35], não ocorre a agregação em grande extensão das NPs durante a formação dos filmes.



**Figura 4.5** – Espectros óticos da matriz de PL e dos nanocompósitos PL/AgB (a) e PL/AgC (b).

Os nanocompósitos PL/AgC apresentaram propriedades óticas diferentes dos seus análogos preparados com NPs de Ag preparadas por redução com o borohidreto. O máximo de absorção destes filmes é entre 450-500 nm observando-se uma banda muito ampla. Este aumento do máximo de absorção e alargamento da banda deve-se às NPs de Ag usadas para a síntese dos



nanocompósitos PL/AgC terem um tamanho maior e uma distribuição de tamanhos também mais alargada. Nestes filmes observa-se um aumento da opacidade em função do aumento do teor de Ag podendo dever-se à aglomeração das NPs de Ag no filme, uma vez que a espessura de todos os filmes é idêntica. Estes resultados são concordantes com os obtidos para os filmes compósitos CH/AgC descritos no capítulo 3.

A análise de SEM dos filmes preparados (Figura 4.6) comprovou a distribuição uniforme das NPs de Ag no filme de PL mas, como verificado nos filmes com quitosano, estes acabam por se deteriorar durante a análise. Este facto acaba por impossibilitar a apresentação de imagens de SEM de boa qualidade, mesmo a baixas voltagens (Figura 4.6b).

Os espectros de FTIR dos nanocompósitos preparados são similares ao da matriz de PL mostrando que o biopolímero mantém a sua identidade química após a formação dos filmes (Figura 4.7).

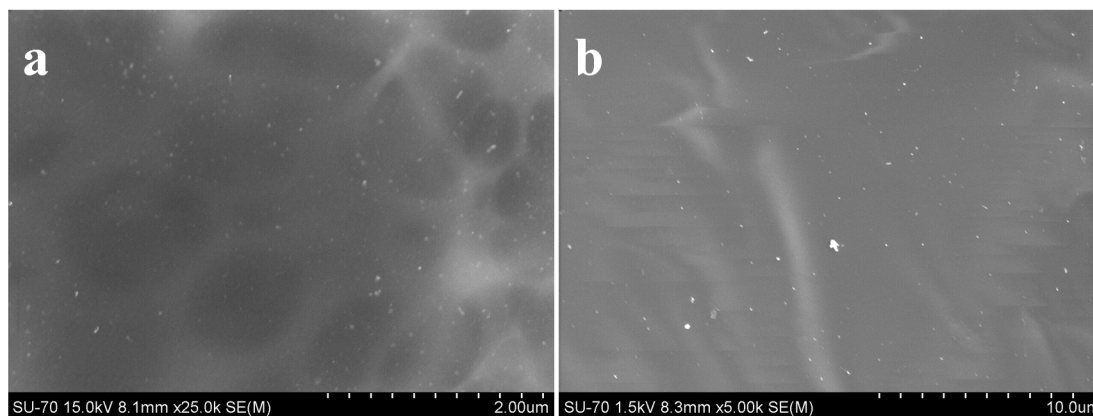


Figura 4.6 – Imagens de SEM do filme PL/AgC5.

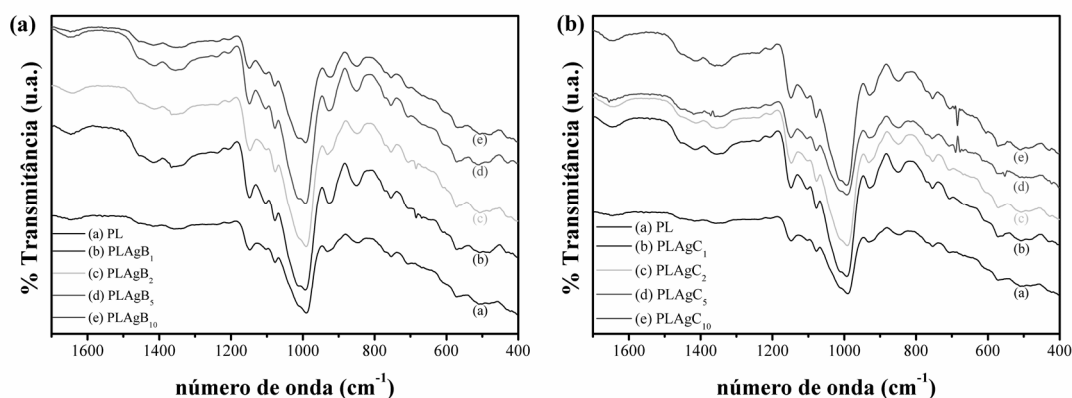
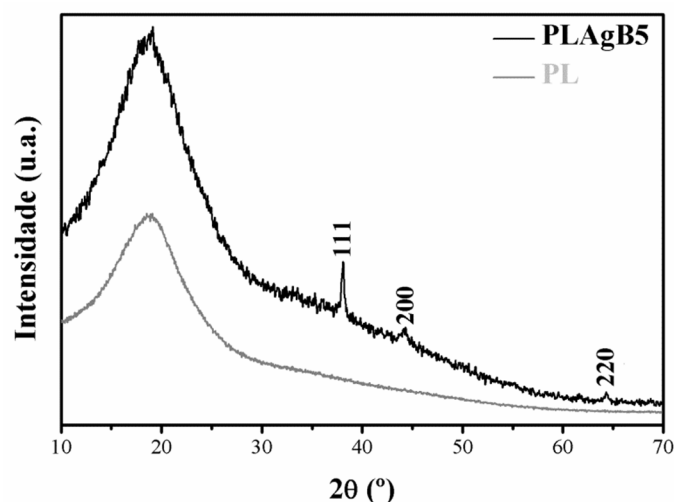


Figura 4.7 – Espectros de FTIR da matriz de PL e dos nanocompósitos PL/AgB (a) e PL/AgC (b).

Nos difratogramas de XRD apresentados na Figura 4.8 para os filmes de PL e PL/AgB5 observou-se que apenas o do nanocompósito apresenta os picos correspondentes à fase Ag metálica. Os picos a valores de  $2\theta = 38,6^\circ$ ,  $44,9^\circ$  e  $64,9^\circ$  são atribuídos aos planos (111), (200) e (220) da estrutura cúbica de faces centradas, respectivamente [36]. O pico largo observado em ambos os difratogramas a  $18,9^\circ$  corresponde ao pululano não modificado [37].



**Figura 4.8** – Difratogramas de raios X da matriz de PL e do nanocompósito PL/AgB5.

### 4.3 Atividade antifúngica dos filmes de pululano/Ag

A atividade antifúngica do filme de PL e dos diversos nanocompósitos preparados foi testada contra o *A. niger*. Foi analisada uma amostra de controlo onde foi utilizado o filme de PL sem a presença de Ag. A eficiência antifúngica dos diversos nanocompósitos PL/Ag, após 4 dias de incubação numa estufa a  $26,5^\circ\text{C}$ , pode ser observada em termos da contagem das unidades formadoras de colônias (CFU.mL<sup>-1</sup> - Figura 4.9) e na percentagem de inibição do crescimento fúngico (FGI - Tabela 4.2).

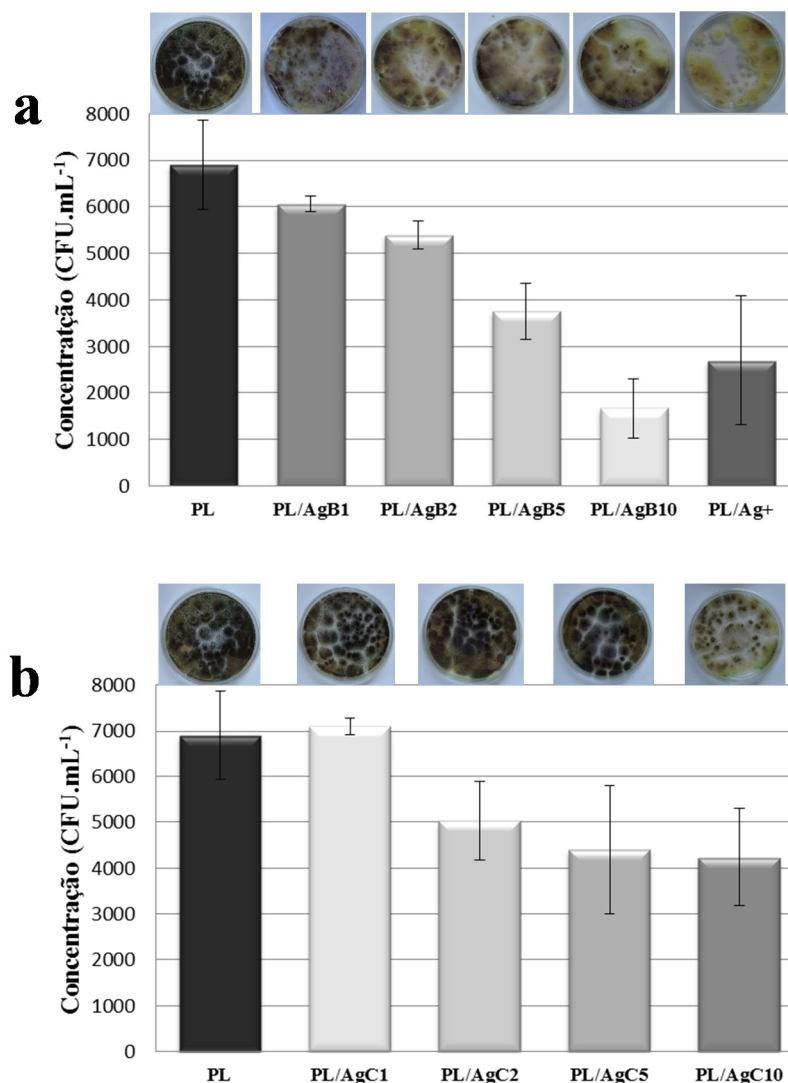
**Tabela 4.2** – Percentagem de inibição do crescimento fúngico (FGI) dos nanocompósitos PL/Ag no crescimento do *A. niger*.

Amostra	PL/AgB <sub>1</sub>	PL/AgB <sub>2</sub>	PL/AgB <sub>5</sub>	PL/AgB <sub>10</sub>	PL/Ag <sup>+</sup>
FGI (%)	12	22	45	76	61

Amostra	PL/AgC <sub>1</sub>	PL/AgC <sub>2</sub>	PL/AgC <sub>5</sub>	PL/AgC <sub>10</sub>
FGI (%)	0	27	36	39





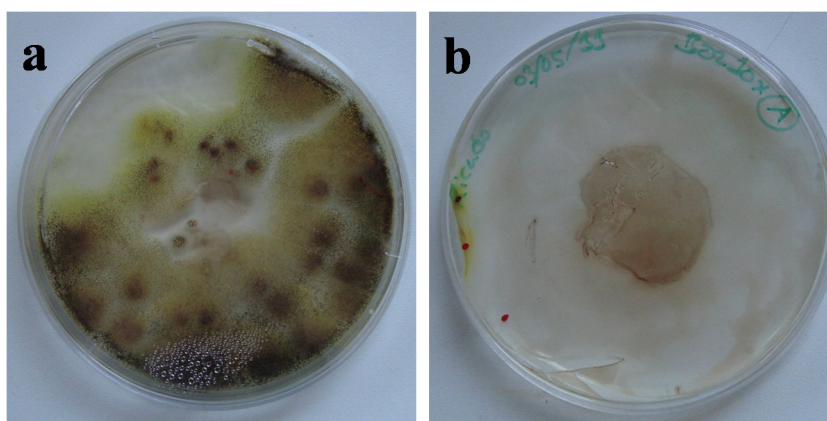
**Figura 4.9** – Efeito do filme de PL e dos nanocompósitos PL/AgB, PL/Ag<sup>+</sup> (a) e PL/AgC (b) no crescimento do *A. niger* (3 ensaios independentes).

Para estas condições de estudo, os resultados obtidos demonstram claramente que os nanocompósitos inibem o crescimento do *A. niger*, dependendo a atividade antifúngica do teor de Ag e do método usado para a preparação das NPs de Ag. Observou-se uma relação direta entre o aumento do teor de Ag nos filmes e a percentagem de inibição (Tabela 4.2), verificando-se o efeito antifúngico mais elevado (FGI = 76%) para a amostra PL/AgB<sub>10</sub>.

Os nanocompósitos com NPs de Ag preparadas por redução com borohidreto mostram uma atividade antifúngica superior aos análogos preparados com NPs de Ag obtidas por redução com citrato. A maior atividade poderá ser justificada pelo menor tamanho das NPs de Ag preparadas por redução com borohidreto, facilitando assim a sua entrada na membrana celular e parede dos fungos.

Verificou-se que no caso dos filmes PL/AgB ocorre um aumento gradual da atividade antifúngica com o aumento do teor de Ag. No caso dos filmes PL/AgC, a partir de teores de aproximadamente 0,1% (m/m), a atividade antifúngica estabiliza.

A relevância do teor de Ag na atividade antifúngica foi confirmada através de um teste específico onde foi usado o mesmo nanocompósito, utilizando-se o dobro da quantidade testada inicialmente (Figura 4.10). Como demonstrado na Figura 4.10b, a placa de agar contendo o dobro da quantidade, na forma de disco (os dois discos foram colocados em cima um do outro), levou a uma inibição mais eficaz do crescimento do fungo.



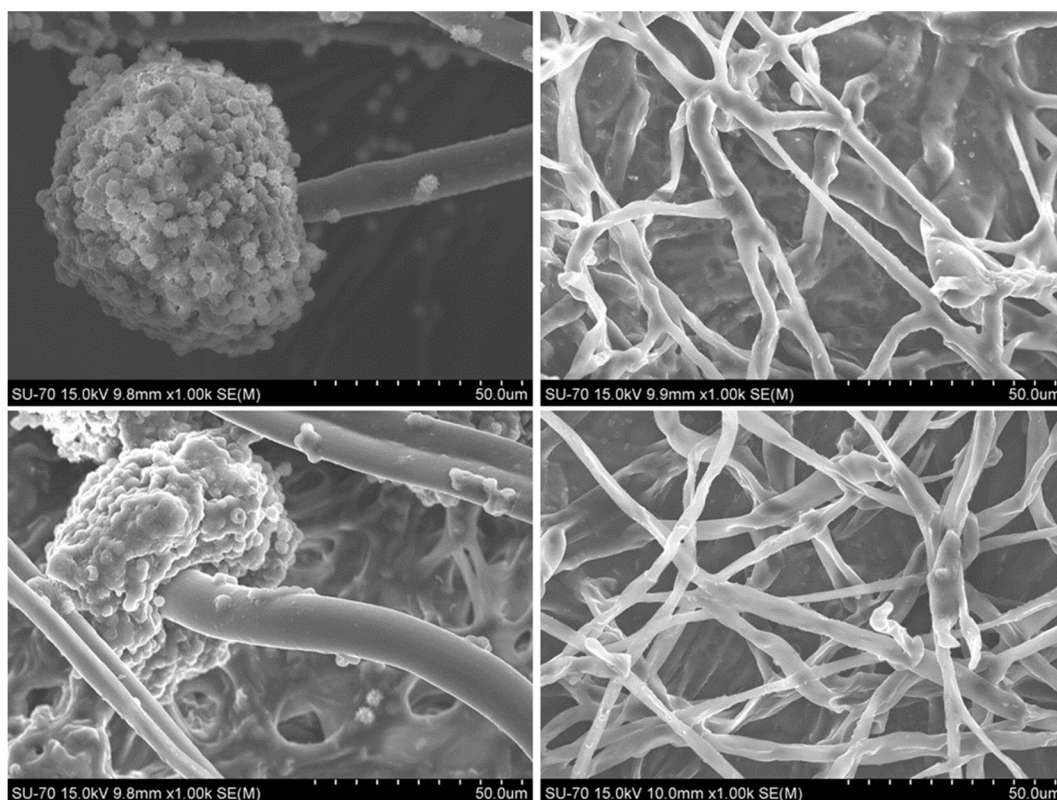
**Figura 4.10** – Fotografias digitais das placas de agar contendo o nanocompósito PL/AgB10 na forma de disco inoculadas com *A. niger*, após 4 dias em contacto: 1 disco (a) e 2 discos (b).

Este resultado é consistente com um processo que envolve a libertação de Ag(I) para o meio de crescimento. De facto, a atividade antimicrobiana das NPs de Ag está associada com mecanismos de libertação de iões  $\text{Ag}^+$  e a processos de oxidação devidos a reações que ocorrem na superfície das NPs [38-40].

Uma discussão fiável neste tópico tem que considerar as diversas variáveis que competem para o mecanismo específico do ponto de vista microbiológico. Em particular, deve-se distinguir a elevada diversidade de NPs de Ag usadas nos diversos estudos publicados que mostram que as características morfológicas e a sua química de superfície podem influenciar a atividade antimicrobiana [41, 42]. Apesar do grande debate nesta temática e do mecanismo de ação antimicrobiano da Ag não ser totalmente compreendido, vários estudos mencionam a relevância da libertação de iões de Ag(I) devido à oxidação da superfície das NPs de Ag quando estão em contacto com o meio dispersante [38, 40, 42]. As espécies solúveis de Ag(I) geradas aderem às membranas celulares dos micro-organismos perturbando drasticamente funções vitais como a respiração, a permeabilidade e a replicação [43]. Num estudo anterior foi demonstrado que o

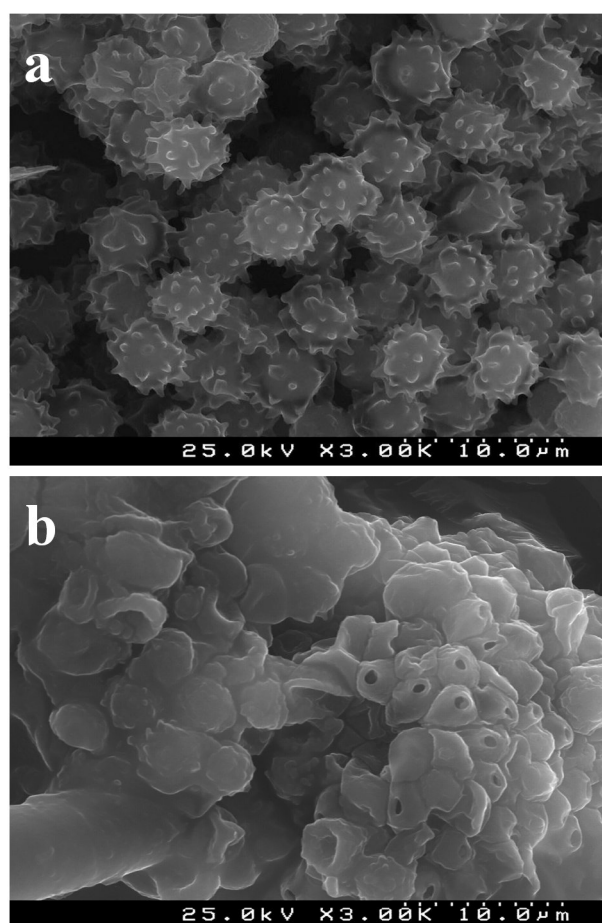
crescimento do *A. niger* é inibido na presença de  $\text{Ag}_2\text{S}$  ( $pK_{sp} = 50,26$ ) suportado em sílica indicando assim um efeito antimicrobiano devido à liberação de prata a partir de um sal insolúvel [38].

Em função destas constatações, avaliou-se a atividade antifúngica do filme de PL com  $\text{AgNO}_3$  (amostra PL/ $\text{Ag}^+$ ) comparando-se a sua atividade antifúngica com a obtida para os filmes de PL contendo NPs de Ag. A amostra PL/ $\text{Ag}^+$  exibiu uma atividade antifúngica superior (FGI = 61%) em comparação com os nanocompósitos com NPs de Ag com teores de prata semelhantes (PL/ $\text{AgB5}$  e PL/ $\text{AgC1}$ , onde se obtiveram um FGI = 45% e 0%, respetivamente). Este resultado confirmou que a inibição do crescimento do *A. niger* deverá estar associada a um mecanismo que envolve a interação do fungo com as NPs de Ag ou com as suas espécies solúveis. Como discutido acima, estes catiões ou complexos de  $\text{Ag(I)}$  podem ser gerados *in situ* devido à oxidação da superfície do metal. Por conseguinte, e como passo seguinte nesta pesquisa, foi monitorizado por SEM o efeito das NPs de Ag no *A. niger* (Figura 4.11). Através da análise da Figura 4.11 verificou-se a presença de pequenas porções dos filmes nos conídios e nas hifas, no entanto os nanocompósitos estudados pareceram não afetar estas duas estruturas.



**Figura 4.11** – Imagens de SEM dos conídios (painel da esquerda) e hifas (painel da direita) do *A. niger* após exposição ao filme PL/ $\text{AgB}_{10}$  (painel inferior) em relação à amostra de controlo PL (painel superior).

Encontra-se descrito que as NPs de Ag provocam danos nas hifas de fungos filamentosos, nomeadamente no *Colletotrichum gloeosporioides* [19]. No entanto, não foram encontradas na literatura evidências experimentais para o efeito das NPs de Ag em esporos de fungos. Este aspeto tem grande importância porque a reprodução do *A. niger* envolve sobretudo a formação de esporos resistentes à dessecação e favoráveis à dispersão. O efeito dos nanocompósitos de PL/Ag nos esporos dos conídeos do *A. niger* para as condições estudadas é mostrado na imagem da Figura 4.12b em comparação com amostra de controlo contendo apenas o filme de PL (Figura 4.12a).

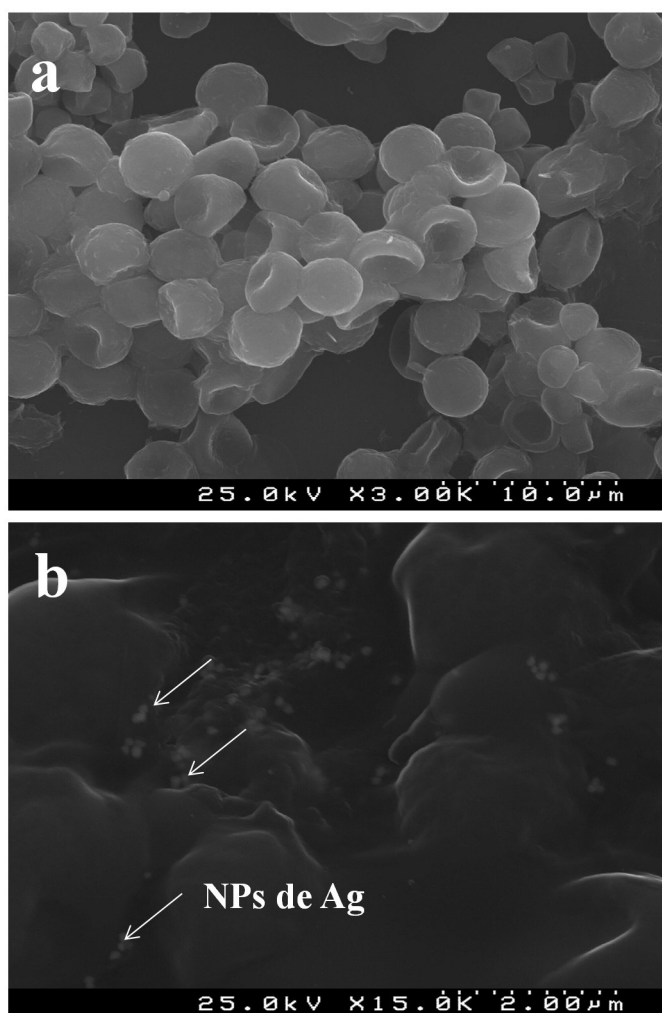


**Figura 4.12** – Imagens de SEM dos esporos do *A. niger*: amostra de controlo (a) e após contacto com o nanocompósito PL/AgB<sub>10</sub> (b).

O efeito disruptivo observado sobre os esporos de *A. niger* é claro por análise dos resultados de SEM. Estes resultados sugerem que os danos nos esporos estão associados às NPs de Ag provavelmente pela rutura das camadas externas das paredes dos esporos com subsequente vazamento do conteúdo citoplasmático causando assim a morte dos esporos. Este efeito verificado nos esporos acaba por ser semelhante ao mecanismo antibacteriano das NPs de Ag sobre diversas

bactérias tal como descrito em vários estudos [39, 44, 45]. A presença das NPs de Ag poderá originar espécies reativas de oxigénio ou que catalisem a oxidação de componentes celulares levando à rutura das membranas celulares.

Uma análise mais detalhada dos esporos do fungo expostos aos nanocompósitos mostrou que este efeito disruptivo é mais pronunciado com o aumento de teor de Ag nos filmes. De facto, para teores elevados de Ag (PL/AgB10, PL/AgC5 e PL/AgC10) a maioria dos esporos já não apresenta a camada superficial característica em forma de picos verificando-se claramente o rompimento da estrutura celular (Figura 4.13a). Em alguns dos testes efetuados, nomeadamente nos que se usaram nanocompósitos onde as NPs de Ag foram preparadas pelo método do citrato, foi possível observar as NPs na superfície dos esporos (Figura 4.13b). É de notar que esta é a primeira vez que esta evidência surge na literatura [46] para a ação de NPs de Ag sob esporos de um fungo.

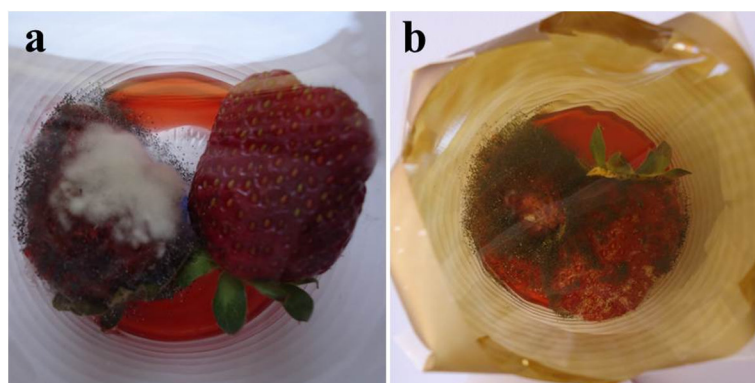


**Figura 4.13** – Imagens de SEM dos esporos do *A. niger* expostos aos nanocompósitos PL/AgB10 (a) e PL/AgC10 (b).

#### 4.4 Avaliação da atividade antifúngica dos nanocompósitos como material de embalagem de frutos

No sentido de se avaliar o interesse prático dos nanocompósitos como material de embalagem fez-se o seguinte teste. A atividade antifúngica dos nanocompósitos foi avaliada selecionando alguns dos nanocompósitos preparados e testando-se a capacidade do filme em retardar/evitar a formação de fungos em morangos. Para uma análise comparativa foi testado o filme de PL como uma amostra de controlo. Neste teste foram selecionados os morangos pois é um fruto suscetível ao aparecimento de fungos como o *A. niger*.

Como o *A. niger* se propaga através da libertação de esporos, inicialmente testou-se a colocação de um morango em boas condições ao lado de um morango com fungos na superfície. Os morangos foram colocados em copos fazendo-se o revestimento dos recipientes com PL e com o filme compósito PL/AgB2. Em ambos os testes, e após 2 dias, os morangos inicialmente em boas condições apresentaram fungos. No entanto o apodrecimento dos morangos inicialmente com fungos levou à decomposição rápida de ambos os morangos. Quando se observou o aparecimento de fungos ambos os morangos estavam praticamente putrefactos (Figura 4.14).

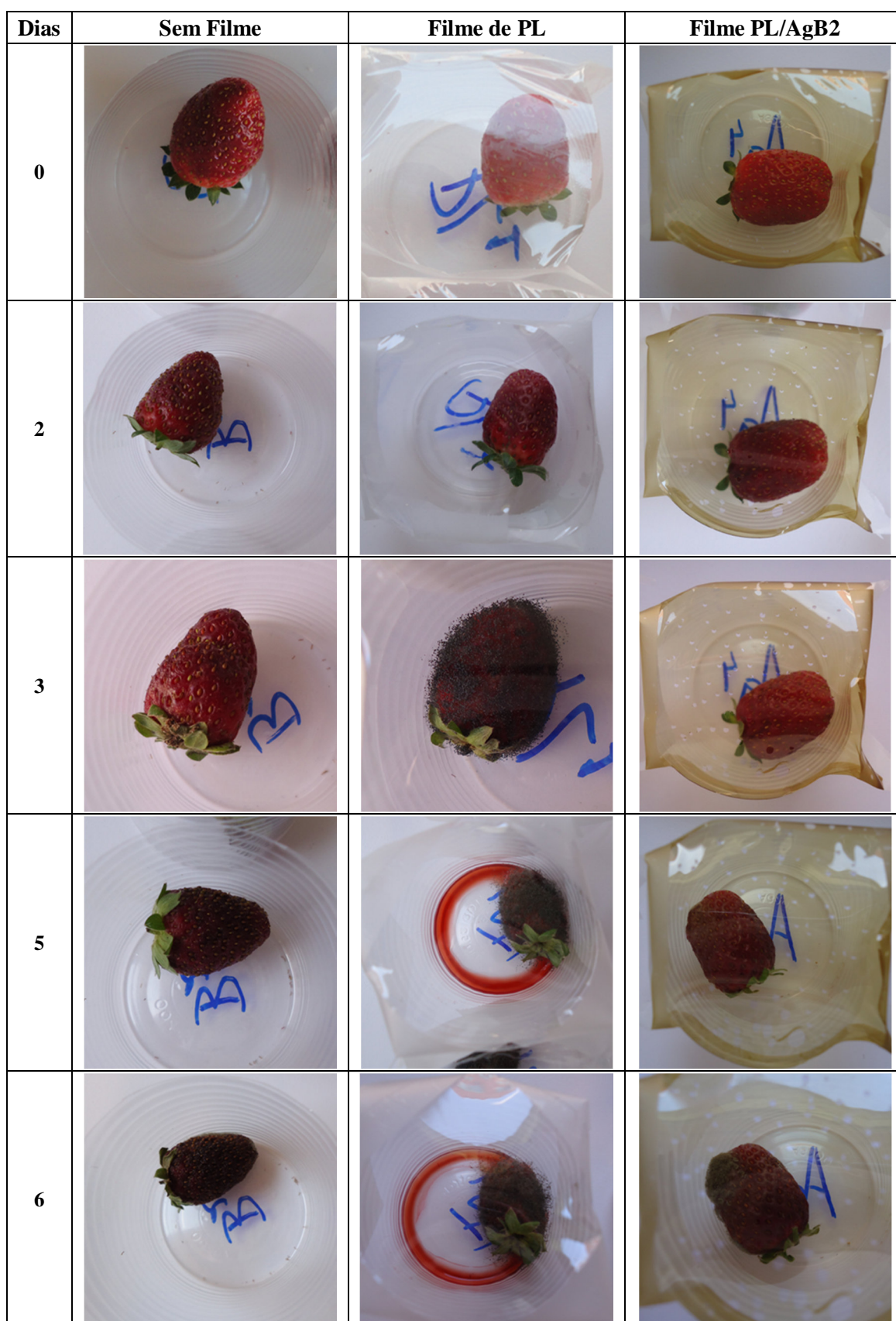


**Figura 4.14** – Fotografias digitais dos morangos no recipiente revestido com filme de PL; t = 0 dias (a) e dos morangos no recipiente revestido com o filme compósito, t = 2 dias (b).

De modo a evitar o apodrecimento dos morangos foi realizado um novo ensaio onde se colocou apenas 1 morango em cada recipiente. Para fins comparativos, neste teste além do copo revestido com o filme de PL e com o nanocompósito PL/AgB2 (ambos com furos), foi verificado o efeito de não colocar qualquer filme para proteção dos morangos.

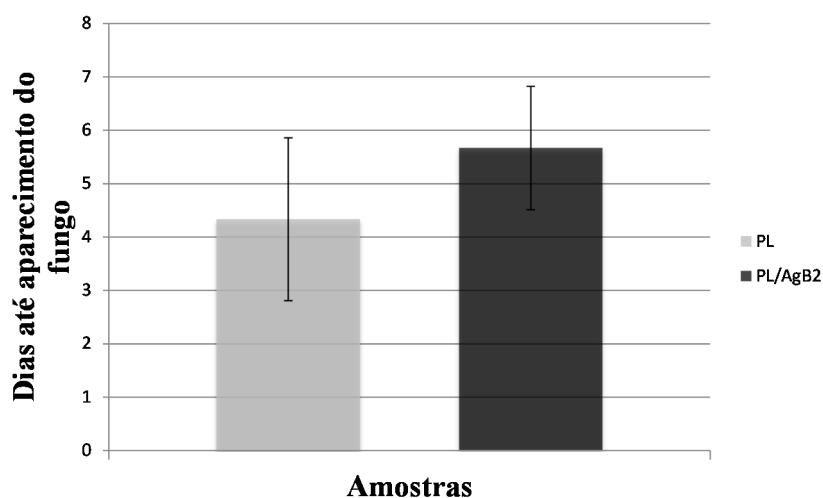
Como se pode observar na Figura 4.15, nos morangos colocados em copos sem filme, não se observou o aparecimento de fungos durante o ensaio. Este facto poderá dever-se à desidratação dos morangos ser facilitada pela ausência de filme.





**Figura 4.15** – Fotografias digitais dos morangos durante o ensaio.

O efeito do revestimento com o filme de PL e com o nanocompósito PL/AgB2 é evidenciado na Figura 4.15 e na Figura 4.16.



**Figura 4.16** – Número de dias decorridos até aparecimento de fungos nos morangos embalados com filme de PL e com o filme compósito PL/AgB2. As barras de erro indicam o respetivo desvio padrão (n =3).

Verificou-se que os morangos embalados com o filme compósito apresentam uma maior resistência ao aparecimento de fungos, demorando em média mais um dia até aparecerem fungos. Apesar da simplicidade do teste realizado, este pretendeu evidenciar a possibilidade de aplicação prática dos filmes obtidos. Naturalmente que este tipo de estudo deveria ser mais elaborado e em condições experimentais perfeitamente controladas.

Os resultados obtidos sugerem que este tipo de películas em revestimentos de proteção de frutos de maior valor económico, ou de materiais de uso médico, poderá ser uma alternativa bastante interessante.



## 4.5 Conclusões

Foi descrita pela primeira vez a preparação e caracterização de filmes compósitos de pululano e NPs de Ag. Os filmes sintetizados exibiram propriedades óticas distintas em função do teor de Ag e da metodologia utilizada na síntese das NPs. Estes filmes mostraram um forte efeito inibitório sobre a esporulação do *A. niger* levando à redução da sobrevivência deste fungo na presença destes materiais. Este efeito disruptivo das NPs de Ag sobre os esporos foi claramente demonstrado pela primeira vez através da análise de SEM. Os nanocompósitos com NPs de Ag de menor tamanho mostram uma percentagem de inibição superior verificando-se um aumento da inibição em função do teor de Ag nos filmes.

No entanto, permanecem em aberto perguntas importantes neste tópico para futuras pesquisas. Como evidenciado por diversos autores, os mecanismos associados à ação antimicrobiana das NPs de Ag não são compreendidos totalmente e neste contexto o conhecimento sobre a atividade antifúngica das NPs é ainda menor. Outra questão importante está relacionada com a eficiência dos materiais contendo Ag(I), ao nível do seu uso como agentes antifúngicos para tempos de exposição prolongados.

A transparência ótica dos filmes de PL/Ag associada à sua bioatividade são características relevantes para o desenvolvimento de materiais de embalagem com atividade antifúngica nomeadamente para materiais médicos e/ou alimentares.

## 4.6 Referências

- [1] Manorama S, Basak P, Singh S. Anti-Microbial Polymer Nanocomposites. In: Trindade T, Daniel-da-Silva A, editors. *Nanocomposite Particles for Bio-Applications*. Singapura: Pan Stanford Publishing; **2011**. p. 249-264.
- [2] Potara M, Jakab E, Damert A, Popescu O, Canpean V, Astilean S. Synergistic antibacterial activity of chitosan-silver nanocomposites on *Staphylococcus aureus*. *Nanotechnology* **2011** 22.
- [3] Fang M, Chen J-H, Xu X-L, Yang P-H, Hildebrand HF. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006** 27, 513-517.
- [4] Wei DW, Sun WY, Qian WP, Ye YZ, Ma XY. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydr. Res.* **2009** 344, 2375-2382.
- [5] Zhang BC, Luo YC, Wang Q. Development of Silver-Zein Composites as a Promising Antimicrobial Agent. *Biomacromolecules* **2010** 11, 2366-2375.
- [6] Perkash N, Amirian G, Dubinsky S, Gazit S, Gedanken A. Ultrasound-assisted coating of nylon 6,6 with silver nanoparticles and its antibacterial activity. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007** 104, 1423-1430.
- [7] Perelshtein I, Apperlot G, Perkash N, Guibert G, Mikhailov S, Gedanken A. Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. *Nanotechnology* **2008** 19.
- [8] Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* **2008** 24, 2051-2056.
- [9] Mbhele ZH, Salemane MG, van Sittert C, Nedeljkovic JM, Djokovic V, Luyt AS. Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites. *Chem. Mater.* **2003** 15, 5019-5024.
- [10] Kim JY, Shin DH, Ihn KJ. Synthesis of poly(urethane acrylate-co-styrene) films containing silver nanoparticles by a simultaneous copolymerization/in situ electron transfer reaction. *Macromol. Chem. Phys.* **2005** 206, 794-801.
- [11] Dallas P, Sharma VK, Zboril R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011** 166, 119-135.
- [12] Siqueira G, Bras J, Dufresne A. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. *Polymers* **2010** 2, 728-765.
- [13] Vimala K, Mohan YM, Sivudu KS, Varaprasad K, Ravindra S, Reddy NN, et al. Fabrication of porous chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facile approach for superior antibacterial application. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2010** 76, 248-258.

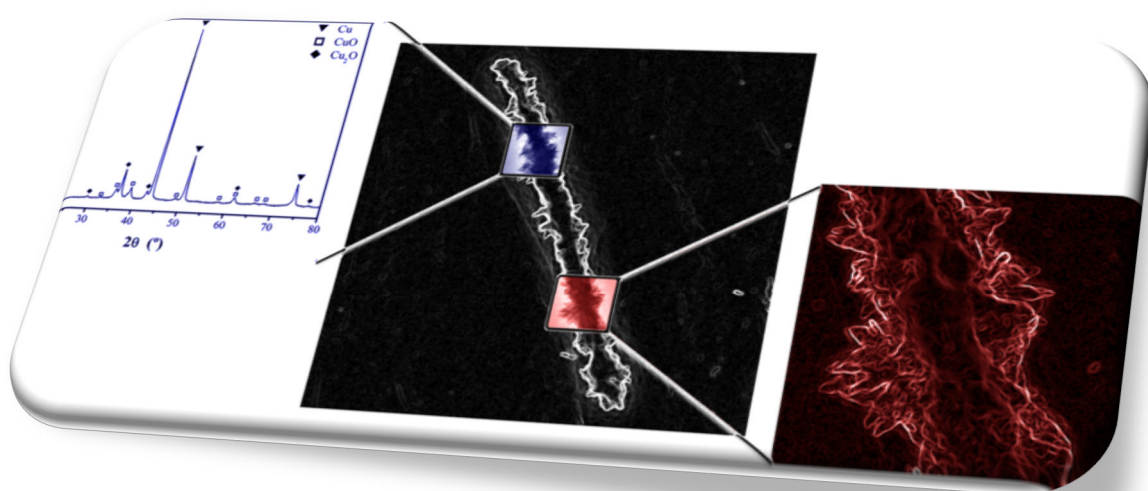
- [14] He JH, Kunitake T, Nakao A. Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chem. Mater.* **2003** 15, 4401-4406.
- [15] Konwarh R, Karak N, Sawian CE, Baruah S, Mandal M. Effect of sonication and aging on the templating attribute of starch for "green" silver nanoparticles and their interactions at bio-interface. *Carbohydr. Polym.* **2011** 83, 1245-1252.
- [16] Ma Y-Q, Yi J-Z, Zhang L-M. A Facile Approach to Incorporate Silver Nanoparticles into Dextran-Based Hydrogels for Antibacterial and Catalytical Application. *J. Macromol. Sci. Part A-Pure Appl. Chem.* **2009** 46, 643-648.
- [17] Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Kalaichelvan PT, Venkatesan R. Mycobased Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Incorporation into Sodium Alginate Films for Vegetable and Fruit Preservation. *J. Agric. Food Chem.* **2009** 57, 6246-6252.
- [18] Jo Y-K, Kim BH, Jung G. Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Dis.* **2009** 93, 1037-1043.
- [19] Lamsal K, Kim SW, Jung JH, Kim YS, Kim KS, Lee YS. Application of Silver Nanoparticles for the Control of *Colletotrichum* Species *In Vitro* and Pepper Anthracnose Disease in Field. *Mycobiology* **2011** 39, 194-199.
- [20] Lee J, Kim K-J, Sung WS, Kim JG, Lee DG. The Silver Nanoparticle (Nano-Ag): a New Model for Antifungal Agents, Silver Nanoparticles. In: Perez DP, editor.: InTech; **2010**. p. 295-308.
- [21] Delpuech J-M, Allemand R. Side effects of fungicides on the abundance and the species diversity of the natural populations of *Drosophila* and their hymenopterous parasitoids in orchards. *Phytoparasitica* **2011** 39, 429-435.
- [22] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydr. Polym.* **2008** 73, 515-531.
- [23] Krochta JM, DeMulderJohnston C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technol.* **1997** 51, 61-74.
- [24] Jung S-W, Jeong Y-I, Kim S-H. Characterization of hydrophobized pullulan with various hydrophobicities. *Int. J. Pharm.* **2003** 254, 109-121.
- [25] Bae H, Ahari AF, Shin H, Nichol JW, Hutson CB, Masaeli M, et al. Cell-laden microengineered pullulan methacrylate hydrogels promote cell proliferation and 3D cluster formation. *Soft Matter* **2011** 7, 1903-1911.
- [26] Akiyoshi K, Kang EC, Kurumada S, Sunamoto J, Principi T, Winnik FM. Controlled association of amphiphilic polymers in water: Thermosensitive nanoparticles formed by self-assembly of hydrophobically modified pullulans and poly(N-isopropylacrylamides). *Macromolecules* **2000** 33, 3244-3249.

- [27] Trovatti E, Fernandes SCM, Rubatat L, Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP. Sustainable nanocomposite films based on bacterial cellulose and pullulan. *Cellulose* **2012** 19, 729-737.
- [28] Trovatti E, Fernandes SCM, Rubatat L, Perez DdS, Freire CSR, Silvestre AJD, et al. Pullulan-nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. *Compos. Sci. Technol.* **2012** 72, 1556-1561.
- [29] Pinto RJB, Fernandes SCM, Freire CSR, Sadocco P, Causio J, Neto CP, et al. Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles. *Carbohydr. Res.* **2012** 348, 77-83.
- [30] Pinto RJB, Marques PAAP, Pascoal Neto C, Trindade T, Daina S, Sadocco P. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. *Acta Biomater.* **2009** 5, 2279-2289.
- [31] Plascencia-Jatomea M, Viniegra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM, Shirai K. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci.* **2003** 3, 582-586.
- [32] Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, van Dijck PWM. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002** 59, 426-435.
- [33] Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **2005** 78, 1-6.
- [34] Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. Brock biology of microorganisms. 11th ed: Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall; **2006**.
- [35] Huang HZ, Yang XR. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydr. Res.* **2004** 339, 2627-2631.
- [36] ICDD PDF4+2011 Arquivo de difração de pós N°. 04-014-0266.
- [37] Karim MR, Lee HW, Kim R, Ji BC, Cho JW, Son TW, et al. Preparation and characterization of electrospun pullulan/montmorillonite nanofiber mats in aqueous solution. *Carbohydr. Polym.* **2009** 78, 336-342.
- [38] Fateixa S, Neves MC, Almeida A, Oliveira J, Trindade T. Anti-fungal activity of SiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>S nanocomposites against *Aspergillus niger*. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2009** 74, 304-308.
- [39] Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano* **2010** 4, 6903-6913.
- [40] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005** 16, 2346-2353.

- [41] Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007** 73, 1712-1720.
- [42] Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Prucek R, et al. Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* **2008** 112, 5825-5834.
- [43] Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Prucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **2009** 30, 6333-6340.
- [44] AshaRani PV, Mun GLK, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009** 3, 279-290.
- [45] Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Phys. Chem. B* **2008** 112, 13608-13619.
- [46] Pinto R, Almeida A, Fernandes S, Freire C, Silvestre A, Pascoal Neto C, et al. Antifungal activity of transparent nanocomposite thin films of pullulan and silver against *Aspergillus niger*. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2012** DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.1009.1045.



## Capítulo 5



### ***PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE QUÍMICA DE NANOESTRUTURAS DE COBRE EM FIBRAS CELULÓSICAS***

Neste capítulo descreve-se a preparação e caracterização de nanocompósitos de celulose à base de cobre. Foi estudado pela 1ª vez o uso da CB na preparação de nanocompósitos celulose/Cu e investigado o processo de oxidação destes materiais quando expostos às condições ambiente. O processo de oxidação para distintos períodos de exposição ao ar foi analisado de modo a verificar o efeito de variáveis como a matriz celulósica (CV ou CB) e a morfologia das nanoestruturas de Cu (esferas ou fios). Foi efetuado o estudo da atividade antibacteriana dos nanocompósitos nomeadamente contra a *S. aureus* e a *K. pneumoniae*.

**CAPÍTULO 5 – PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE QUÍMICA DE NANOESTRUTURAS DE COBRE EM FIBRAS CELULÓSICAS**

5.1 Introdução.....	137
5.2 Preparação e caracterização de nanoestruturas de cobre e de nanocompósitos celulose/Cu	140
5.2.1 Preparação e caracterização de NPs de Cu e de nanocompósitos celulose/NPs Cu.....	140
5.2.2 Preparação e caracterização de NFs de Cu e de nanocompósitos celulose/NFs Cu.....	147
5.3. Estudos de atividade antibacteriana em nanocompósitos celulose/Cu.....	152
5.4. Conclusões.....	155
5.5. Referências .....	156



## **5.1 Introdução**

O desenvolvimento de nanocompósitos com propriedades novas e melhoradas tem levado a avanços significativos em diversas aplicações incluindo dispositivos óticos, eletrônicos e produtos biotecnológicos. Devido às propriedades das nanoestruturas serem dependentes do seu tamanho e forma, a comunidade científica tem vindo a apostar no estudo destas características [1-4].

Entre as nanoestruturas estudadas, as NPs de metais nobres têm-se evidenciado, nomeadamente as NPs de Au, Ag e Pd, devido a serem mais resistentes relativamente à oxidação [5-7]. Ao contrário dos metais nobres, as NPs de Cu apresentam a limitação de serem instáveis quimicamente conduzindo a uma rápida oxidação quando mantidas em condições ambiente [4, 8-11]. Apesar deste facto, os nanocompósitos contendo cargas de Cu têm despertado um enorme interesse no fabrico de materiais de baixa resistência elétrica devido às suas propriedades condutoras e por serem uma alternativa potencialmente mais económica [12]. A utilização de nanocompósitos com NPs de Cu em aplicações antimicrobianas, nomeadamente na inibição do crescimento de bactérias, fungos e algas, assim como em catálise na produção de hidrogénio são outras aplicações já descritas para este tipo de materiais [13, 14].

Têm sido desenvolvidas diversas metodologias químicas e físicas para a síntese de nanoestruturas de cobre das quais se destacam a redução de sais de cobre(II) com agentes redutores distintos [15, 16], método do poliol [8], redução térmica [17], micoemulsão [18] ou deposição em fase gasosa e ablação por laser [19-21]. A maioria destes métodos é realizada em ambientes isentos de oxigénio (atmosfera de gás inerte) ou através da adição de estabilizantes químicos [4, 9]. No entanto, a remoção completa destes aditivos da superfície das NPs é muitas vezes complexa e, em alguns casos, tem um efeito prejudicial na aplicação prevista como por exemplo em catálise [9].

O controlo do tamanho e da morfologia tem sido usado para ajustar tanto as propriedades óticas como a reatividade química das NPs metálicas [22]. A preparação de NPs de Cu com geometrias distintas da esférica, como por exemplo nanofios (NFs), permite aumentar a estabilidade química dos materiais preparados (retardar a oxidação quando expostos ao ar) [23]. Esta vantagem é crucial no desenvolvimento de materiais para aplicação em condução elétrica. Para além disso, o uso desta morfologia pode abrir novas perspetivas em catálise [24, 25]. Por exemplo em estudos de eletrocatalise os NFs de Pt exibem uma excelente atividade superficial específica ( $1,45 \text{ mA/cm}^2$ ) quando comparados com outras geometrias como nanotubos ( $0,38 \text{ mA/cm}^2$ ) ou NPs esféricas ( $0,25 \text{ mA/cm}^2$ ) [24].

Apesar do progresso notável na síntese de nanoestruturas de cobre com várias morfologias [26], a sua produção em larga escala e posterior utilização em nanocompósitos à base de Cu, em condições ambiente, constitui ainda um grande desafio. Este facto é particularmente importante quando o objetivo é o desenvolvimento de materiais baratos e de uso generalizado como, por exemplo, a preparação de compósitos poliméricos contendo NPs inorgânicas [13, 27, 28]. O fabrico em larga escala e bem-sucedido de produtos de base de celulósica contendo cobre implicará o desenvolvimento de métodos que promovam a estabilidade química da nanofase metálica retardando e/ou evitando a sua oxidação quando em condições normais de utilização.

O número de trabalhos publicados nesta temática é bastante reduzido, tendo-se encontrado apenas algumas referências [13, 29-32]. O desenvolvimento de materiais antibacterianos por deposição eletrostática de NPs de Cu em fibras de algodão [13], o uso da celulose microcristalina como suporte poroso natural para os iões cobre(II) [29, 30], e a modificação superficial das fibras celulósicas com quitosano de modo a imobilizar os iões de cobre num primeiro passo seguindo-se a sua redução com um agente redutor comum como o borohidreto [31] são alguns dos trabalhos descritos. Li *et al.* [32] descreveu um método no qual a celulose é usada como agente redutor para a conversão do CuO em Cu através de síntese hidrotérmica em meio alcalino, na qual também é possível obter compostos de valor acrescentado como o ácido láctico ou o ácido acético.

Nas metodologias já descritas para a obtenção de nanocompósitos celulose/Cu é normalmente usado um agente redutor como o borohidreto de sódio, sob atmosfera inerte, para redução dos iões de Cu(II). No entanto, também neste caso, um dos problemas é a inerente reatividade química das NPs de Cu no nanocompósito relativamente à oxidação, quando expostos ao ar, mesmo para tempos de exposição reduzidos. Este facto não só limita o uso destes materiais em estudos fundamentais em condições ambiente, como também diminui as suas aplicações potenciais como por exemplo em materiais condutores (elétricos, térmicos,...) ou em biossensores [33].

Neste contexto, o desenvolvimento de materiais à base de papel contendo nanoestruturas de cobre é um desafio devido à tendência das NPs de Cu oxidarem em contacto com o ar. O trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo no crescimento de NPs inorgânicas distintas em fibras celulósicas [34-37] levou ao estudo da utilização deste biopolímero como matriz natural para proteger as nanoestruturas de Cu através da sua preparação *in situ* ou pós deposição. Embora existam alguns trabalhos publicados sobre a utilização de compósitos celulose/Cu, este trabalho descreve pela primeira vez o estudo comparativo a nível do crescimento e estabilidade química de nanoestruturas de Cu em matrizes celulósicas distintas como a CV e a CB. Atendendo às diferenças já evidenciadas entre estes dois substratos [38, 39], nomeadamente a arquitetura tridimensional e

elevada capacidade de retenção de água da CB, é razoável assumir que o crescimento e estabilidade das nanoestruturas irão depender do tipo de celulose usada na síntese dos nanocompósitos.

Foram realizados uma série de ensaios tendo em conta esta possibilidade variando-se o tipo de celulose, a morfologia das nanoestrutura de cobre e a metodologia de síntese de modo a obter um leque alargado de nanocompósitos. O estudo comparativo destes materiais poderá abrir novas perspectivas em relação à síntese e ao processo de oxidação dos nanocompósitos, assim como em relação às aplicações para este tipo de estruturas.

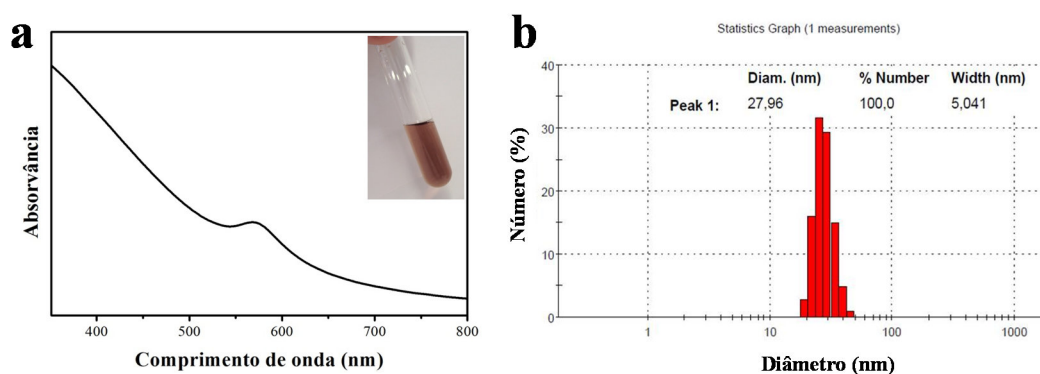
Este capítulo encontra-se dividido em três partes. Na primeira parte será descrita a síntese e a caracterização de NPs de Cu assim como dos nanocompósitos correspondentes, sendo evidenciado o estudo do processo de oxidação dos nanocompósitos ao longo do tempo quando expostos ao ar. Na segunda parte será descrita a síntese e a caracterização de NFs de Cu e dos nanocompósitos correspondentes. Neste ponto além do estudo do processo de oxidação dos nanocompósitos celulose/NFs Cu será realizado o estudo comparativo com os nanocompósitos análogos preparados com NPs de Cu. Na última parte será demonstrada a utilização dos nanocompósitos em estudos de atividade antibacteriana.

## 5.2 Preparação e caracterização de nanoestruturas de cobre e de nanocompósitos celulose/Cu

### 5.2.1 Preparação e caracterização de NPs de Cu e de nanocompósitos celulose/NPs Cu

Os coloides de Cu foram sintetizados através do método descrito por Loo *et al.* [16]. Esta metodologia baseia-se na redução de catiões cúpricos usando o  $\text{NaBH}_4$  como agente redutor sob atmosfera de  $\text{N}_2$  e em solução aquosa.

A Figura 5.1 a apresenta o espectro ótico dos coloides de Cu obtidos por este método. Na síntese foi obtido um coloide de cor vermelha que, tal como no caso dos coloides de ouro e prata, apresenta uma banda de SPR no visível. Através da análise da figura observa-se que o coloide tem uma banda com máximo de absorção a 568 nm [17, 40].

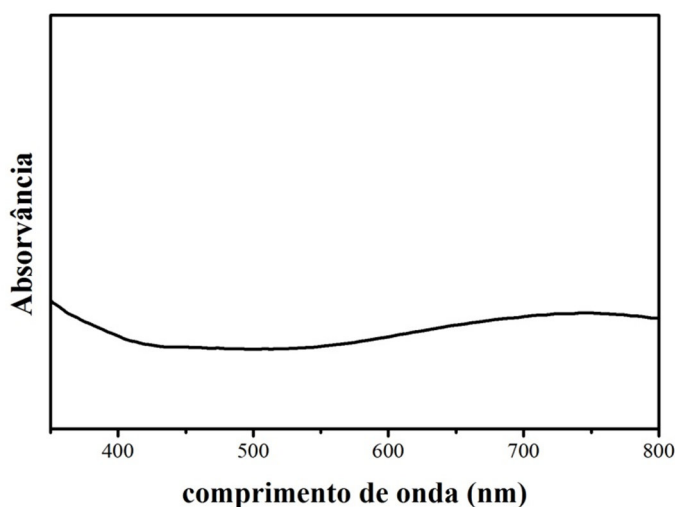


**Figura 5.1** – Espectro ótico, correspondente fotografia digital (a) e análise de DLS da distribuição de tamanhos (b) do coloide de Cu.

A distribuição de tamanhos de partícula obtida por DLS para o coloide (figura 5.1b) logo após a sua preparação indicou a presença de partículas com um diâmetro médio de  $28 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ . O valor de tamanho obtido foi validado através da análise de TEM, tendo-se obtido um tamanho idêntico ( $27 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ ). Esta pequena diferença poderá dever-se a que no DLS é obtido o diâmetro hidrodinâmico das NPs de Cu.

No entanto, uma desvantagem inerente à utilização do coloide de Cu é a sua instabilidade química quando exposto ao ar pois, mesmo para intervalos de tempo curtos, as NPs de Cu têm tendência a oxidar. Este facto, observado experimentalmente durante a realização deste trabalho, acaba por limitar o uso das NPs de Cu [33]. Verificou-se que a banda SPR do coloide de Cu desaparece em menos de 24 horas quando é exposto ao ar (condições ambiente) levando à obtenção de uma solução inicialmente esverdeada que após algum tempo fica azul translúcida (Figura 5.2).

Este facto poderá dever-se à formação de espécies catiónicas de cobre(II) na solução tais como por exemplo  $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^{2-}$ .

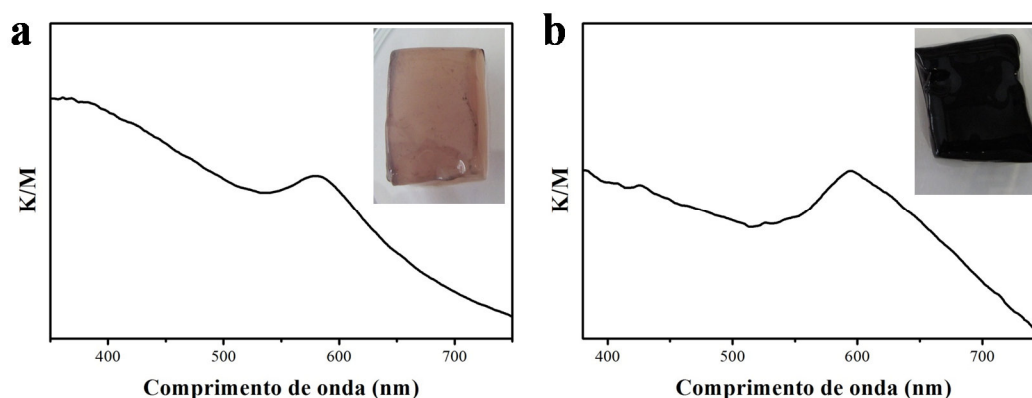


**Figura 5.2** – Espectro óptico do colóide de Cu após 24 horas de exposição ao ar.

Para transpor este obstáculo foi estudada a síntese destas estruturas de Cu finamente divididas em biopolímeros de modo a limitar, pelo menos em certa medida, a oxidação do metal e que poderá eventualmente levar à obtenção de nanocompósitos quimicamente estáveis. Atendendo aos trabalhos já publicados pelo nosso grupo e experiência nesta temática, nomeadamente na síntese de diversas NPs inorgânicas em substratos celulósicos [23, 34, 35], investigou-se a utilização deste biopolímero como matriz natural para a proteção das NPs de Cu. Estes estudos mostraram que as fibras celulósicas possuem a capacidade de reduzir sais metálicos às nanofases metálicas respetivas, como por exemplo ouro ou prata, podendo também ser usadas como matriz para deposição de NPs previamente preparadas.

A metodologia seguida para a síntese dos nanocompósitos celulose/ NPs Cu consistiu na síntese das NPs na presença das matrizes celulósicas, nomeadamente CV e CB. A síntese *in situ*, como evidenciado no capítulo 1, é uma das principais estratégias descritas na literatura para a preparação de bionanocompósitos [41, 42].

A Figura 5.3 mostra os espectros ópticos dos nanocompósitos obtidos seguindo esta metodologia e usando a CB como substrato. É possível observar que dependendo da concentração de sal de cobre(II) usada a cor dos nanocompósitos obtida é distinta. Comparando os espectros ópticos dos nanocompósitos com o espectro do colóide inicial de Cu, observa-se um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda superiores (568 nm colóide, 580 nm e 595 nm para os nanocompósitos).



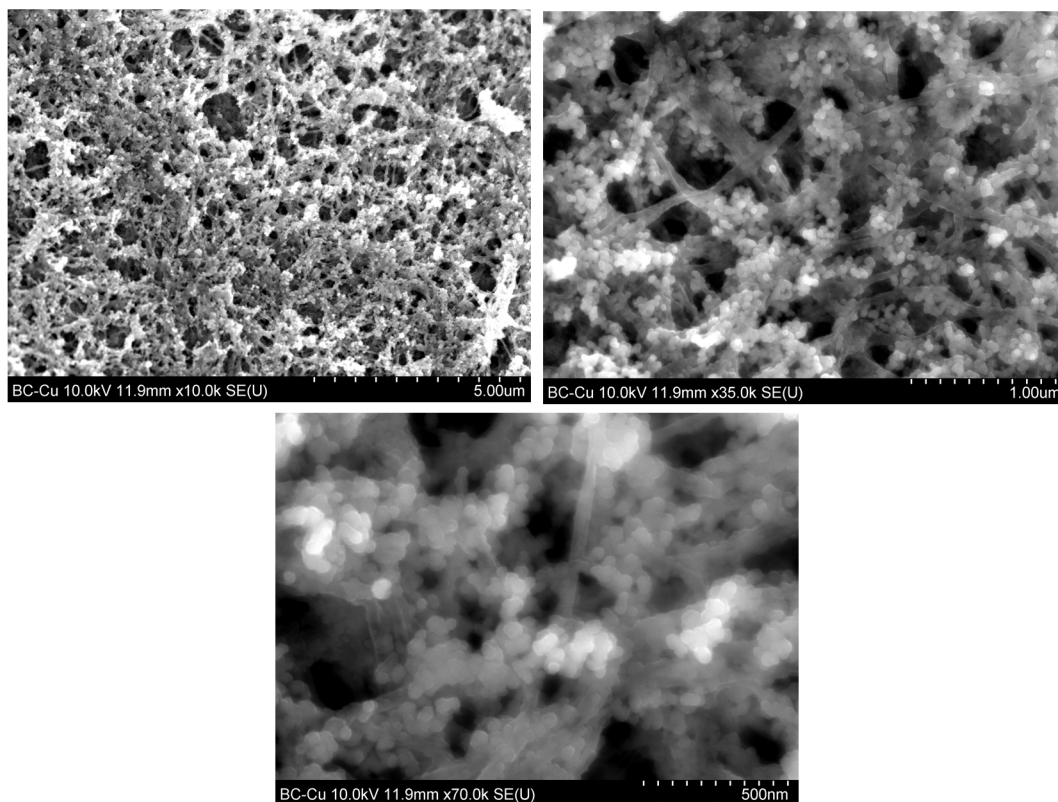
**Figura 5.3** – Espectros óticos (função Kubelka/Munk) dos nanocompósitos CB/NPs Cu com as correspondentes fotografias digitais; concentração inicial de sal de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ): 0,01 (a) e 0,1 M (b).

Este comportamento foi verificado em nanocompósitos celulose/Au [36], celulose/Ag (Capítulo 2), quitosano/Ag e quitosano/Au (Capítulo 3), podendo dever-se às razões já descritas.

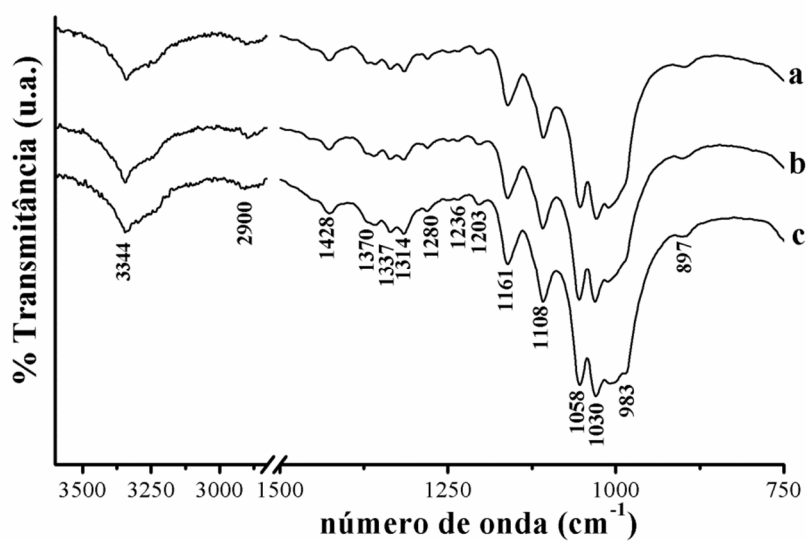
Na Figura 5.4 são apresentadas algumas imagens de SEM dos nanocompósitos obtidos. Estas imagens mostram uma ampla cobertura das fibras com NPs de Cu bem definidas (tamanho médio de aproximadamente 36 nm). Do mesmo modo ao verificado nos nanocompósitos de CB com Au e Ag [36, 43], as NPs de Cu não se soltam das fibras após imersão em água e agitação mecânica vigorosa. Esta é uma indicação de que as NPs de Cu estão retidas no nanocompósito e possivelmente ocorre uma adsorção química entre as fibras celulósicas e as NPs de Cu. É de salientar que a CB possui uma estrutura porosa composta por uma rede tridimensional de nanofibras, pelo que além das partículas ficarem depositadas à sua superfície estas podem ter sido incorporadas dentro da sua nanoestrutura através de um processo de difusão.

A fim de investigar as transformações químicas que ocorrem no nanocompósito CB/Cu NPs, este material foi avaliado durante diferentes períodos de tempo de exposição ao ar. A Figura 5.5 apresenta os espectros de FTIR do nanocompósito e da CB pura.

Através da análise dos espectros de FTIR é possível observar que as bandas de absorção relativas à CB surgem a  $3344\text{ cm}^{-1}$  (elongação OH),  $2900\text{ cm}^{-1}$  (elongação CH),  $1428\text{ cm}^{-1}$  (flexão  $\text{CH}_2$ ),  $1370\text{ cm}^{-1}$  e  $1280\text{ cm}^{-1}$  (flexão C-H),  $1314\text{ cm}^{-1}$  (flexão OH),  $1337\text{ cm}^{-1}$ ,  $1236\text{ cm}^{-1}$  e  $1203\text{ cm}^{-1}$  (flexão C-O-H),  $1161\text{ cm}^{-1}$  (elongação C-O-C),  $1058\text{ cm}^{-1}$  (elongação CO e CC),  $1030\text{ cm}^{-1}$  e  $983\text{ cm}^{-1}$  (elongação CO) [44]. Estas bandas não sofrem alteração quando passamos para os nanocompósitos. Esta análise evidencia que não ocorre degradação química das fibras celulósicas após a deposição das NPs de Cu, nem após o nanocompósito ser exposto ao ar durante várias semanas.



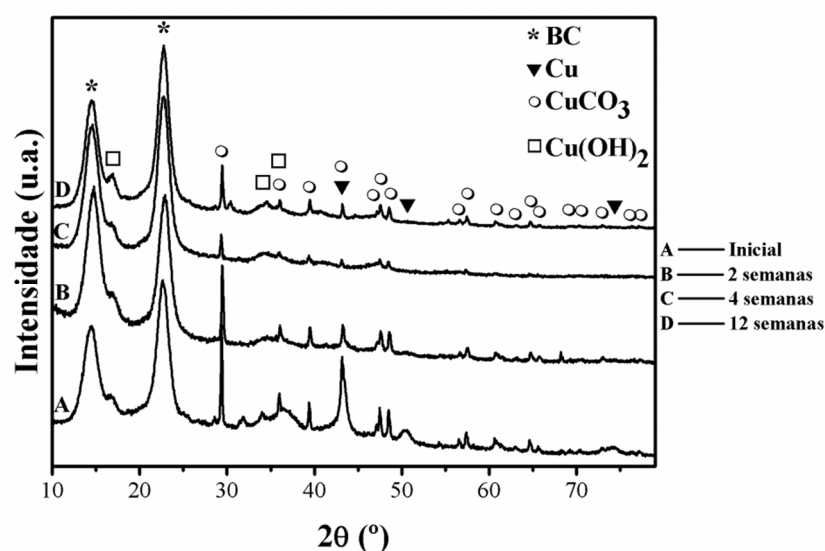
**Figura 5.4** – Imagens de SEM dos nanocompósitos CB/NPs Cu.



**Figura 5.5** – Espectros de FTIR da CB pura (a) e do nanocompósito CB/NPs Cu: após a preparação (b) e após 6 semanas de exposição ao ar (c).

A estrutura cristalina dos nanocompósitos CB/NPs Cu foi investigada por XRD de modo a estudar as fases inorgânicas dispersas nas fibras. A Figura 5.6 apresenta o difratograma de raios X do nanocompósito após a síntese e para tempos distintos de exposição ao ar da amostra.

Verificou-se que, para o nanocompósito recém-preparado, está presente uma fase identificada como Cu metálico. Como se pode observar surgem 3 picos característicos da estrutura cúbica de faces centradas do cobre a  $2\theta = 43,3^\circ$ ,  $50,5^\circ$  e a  $74,1^\circ$  atribuídos aos planos (111), (200) e (220) [8]. Os picos mais intensos observados a  $2\theta = 15^\circ$  e  $22,5^\circ$  são devidos à CB, nomeadamente às fases  $I_\alpha$  e  $I_\beta$  [45]. Além dos picos atribuídos às fases da CB e Cu metálico observam-se picos atribuídos ao  $\text{CuCO}_3$  e  $\text{Cu(OH)}_2$  [46, 47]. A presença do  $\text{CuCO}_3$  pode ser explicada devido à hidrólise de  $\text{CO}_2$  atmosférico e/ou ao carbonato vestigial que permaneceu na CB após a sua produção (ver secção experimental). O  $\text{Cu(OH)}_2$  poderá resultar da hidrólise do Cu(II) durante a síntese *in situ* dos nanocompósitos.



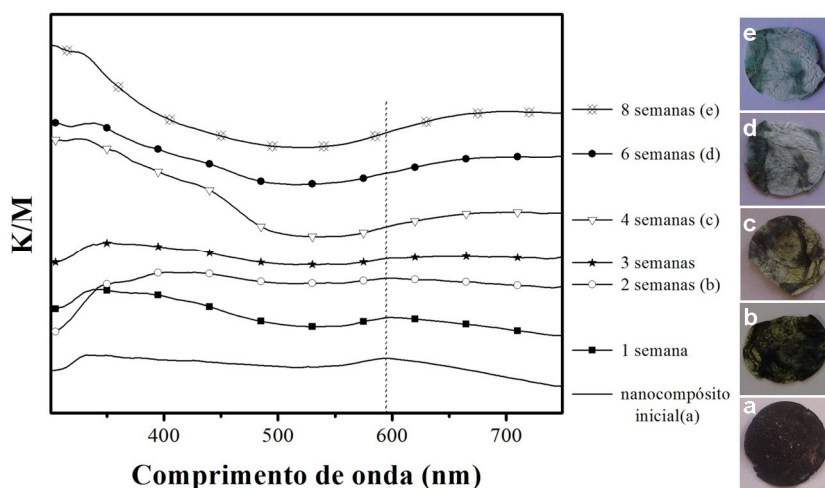
**Figura 5.6** – Difratogramas de raios X do nanocompósito CB/NPs Cu para tempos distintos de exposição ao ar. Fases: BC (\*), Cu (▼),  $\text{CuCO}_3$  (○) e  $\text{Cu(OH)}_2$  (□).

Através da análise do difratograma conclui-se que não há uma evidência clara da presença de  $\text{CuO}$  e  $\text{Cu}_2\text{O}$  na amostra. No entanto, a presença de óxidos de cobre não pode ser excluída pois estas fases podem estar presentes em quantidades muito baixas e os picos de XRD correspondentes, nomeadamente na região de  $2\theta$  entre  $30\text{--}40^\circ$ , podem estar encobertos. O estudo dos nanocompósitos ao longo do tempo de exposição ao ar mostrou que os picos relativos à fase de Cu metálico desaparecem para tempos de exposição relativamente curtos não sendo a sua presença clara após 2 semanas.



O  $\text{CuCO}_3$  é um composto verde-azulado cuja cor pode variar de azul claro a verde devido à presença de uma mistura de carbonato de cobre(II) e carbonato de cobre básico em vários estados de hidratação. A análise de cor dos nanocompósitos preparados, para tempos prolongados de exposição ao ar, altera-se para uma cor verde-azulada (Figura 5.7). Estas alterações de cor estão, obviamente, associadas a reações químicas que envolvem o cobre e os seus iões.

Através da análise dos espectros óticos da Figura 5.7, observa-se que a banda correspondente às NPs de Cu ( $\lambda_{\text{máx}} = 595 \text{ nm}$ ) acaba por desvanecer nos espectros óticos 2-3 semanas após a preparação dos materiais. Esta observação confirma o resultado obtido através da análise do difratograma de XRD do nanocompósito uma vez que no espectro é visível um aumento da banda de absorção na região espectral entre 300-500 nm e 600-800nm, provavelmente devido à presença de espécies de Cu(II) resultantes da oxidação das NPs Cu nomeadamente através da formação de  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ .



**Figura 5.7** – Espectros óticos (função Kubelka/Munk) dos compósitos CB/NPs Cu para tempos distintos de exposição ao ar com as fotografias digitais respetivas: nanocompósito inicial (a), 2 semanas (b), 4 semanas (c), 6 semanas (d) e 8 semanas (e).

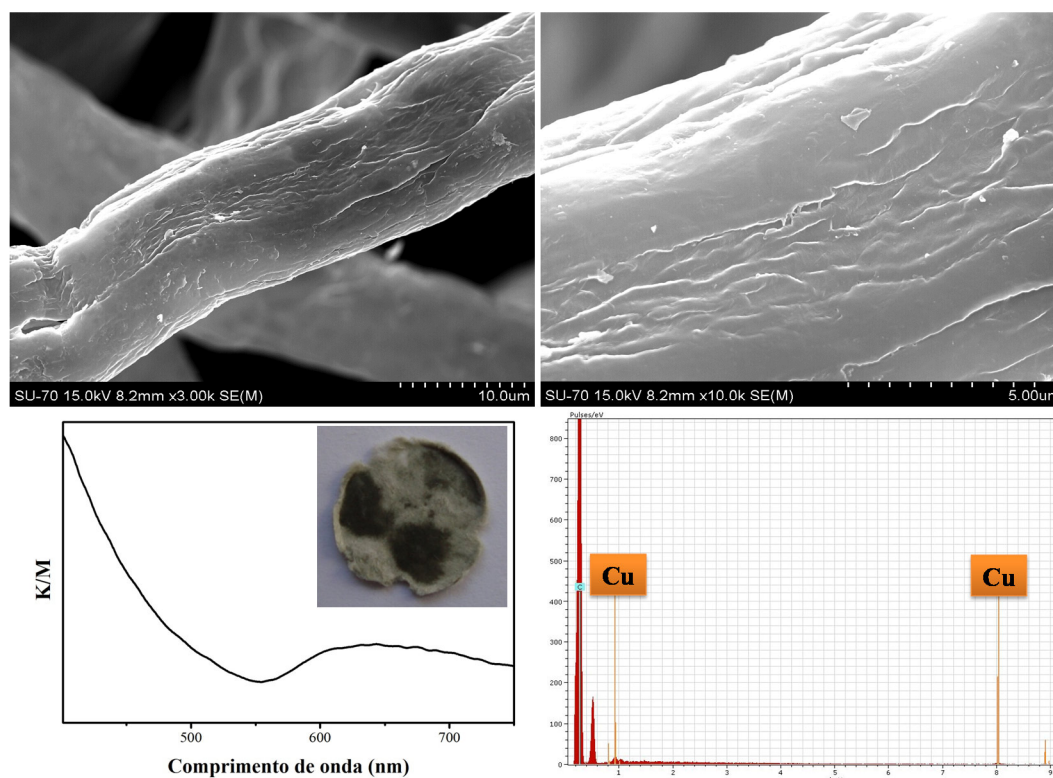
Os resultados apresentados parecem indicar que a obtenção *in situ* das NPs de Cu na matriz da CB melhora a estabilidade química ao nível da oxidação (pelo menos durante duas semanas) em relação ao coloide exposto ao ar. Estas observações são uma evidência clara que a CB tem um efeito inibitório na oxidação das NPs de Cu incorporadas na sua nanoestrutura.

Este facto contrasta com a estabilidade química observada para as NPs de Cu incorporadas nas fibras de CV, preparadas através da mesma metodologia descrita para a CB. Neste caso os nanocompósitos adquiriram uma cor verde imediatamente após a síntese das NPs, mostrando uma

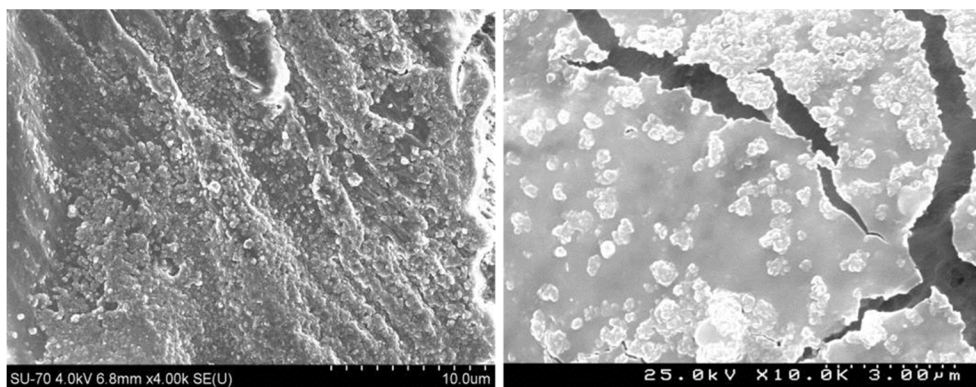
oxidação bastante rápida em comparação com a oxidação lenta verificada para os nanocompósitos análogos de CB (Figura 5.8).

Uma explicação para este comportamento distinto entre os nanocompósitos com CV e com CB, relativamente à oxidação do cobre, poderia ser dada com base na composição química destes dois tipos de fibras. No entanto, ambas as matrizes têm uma composição química similar [39] o que sugere que neste caso este parâmetro não será em princípio determinante. Outra explicação possível reside nas características morfológicas distintas entre estes dois substratos. A estrutura molecular da CV é idêntica à da CB mas as fibras de CV formam uma estrutura aberta em que a entrada de oxigénio é maior, facilitando a oxidação das NPs de Cu. Por outro lado, a CB é uma estrutura porosa composta por uma rede tridimensional de nanofibras que se entrelaçam de tal forma que acabam por atuar de certo modo como barreira à oxidação das NPs de Cu [48].

Um facto consistente com esta explicação poderá ser a função desempenhada pela rede de nanofibras nas primeiras fases de oxidação das NPs de Cu. Estas nanofibras poderão atuar como suporte na formação de um revestimento protetor, limitando a difusão de oxigénio para dentro da matriz de CB. Efetivamente, esta hipótese foi posteriormente confirmada por análise de SEM a vários compósitos de CB/NPs Cu expostos ao ar (Figura 5.9).



**Figura 5.8** – Imagens de SEM do nanocompósito CV/NPs Cu, espectro ótico com a fotografia digital respetiva e espectro de EDX confirmando a presença de cobre.



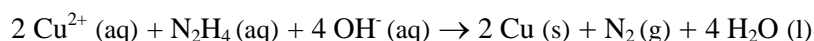
**Figura 5.9** – Imagens de SEM dos compósitos CB/NPs Cu após seis semanas de exposição ao ar.

Os resultados mostram que as NPs na superfície das nanofibras, que são mais propensas à oxidação, originaram um filme na superfície exterior da matriz. Como consequência esta película poderá ter limitado a extensão da oxidação evitando/retardando a oxidação das NPs de Cu localizadas no interior do nanocompósito.

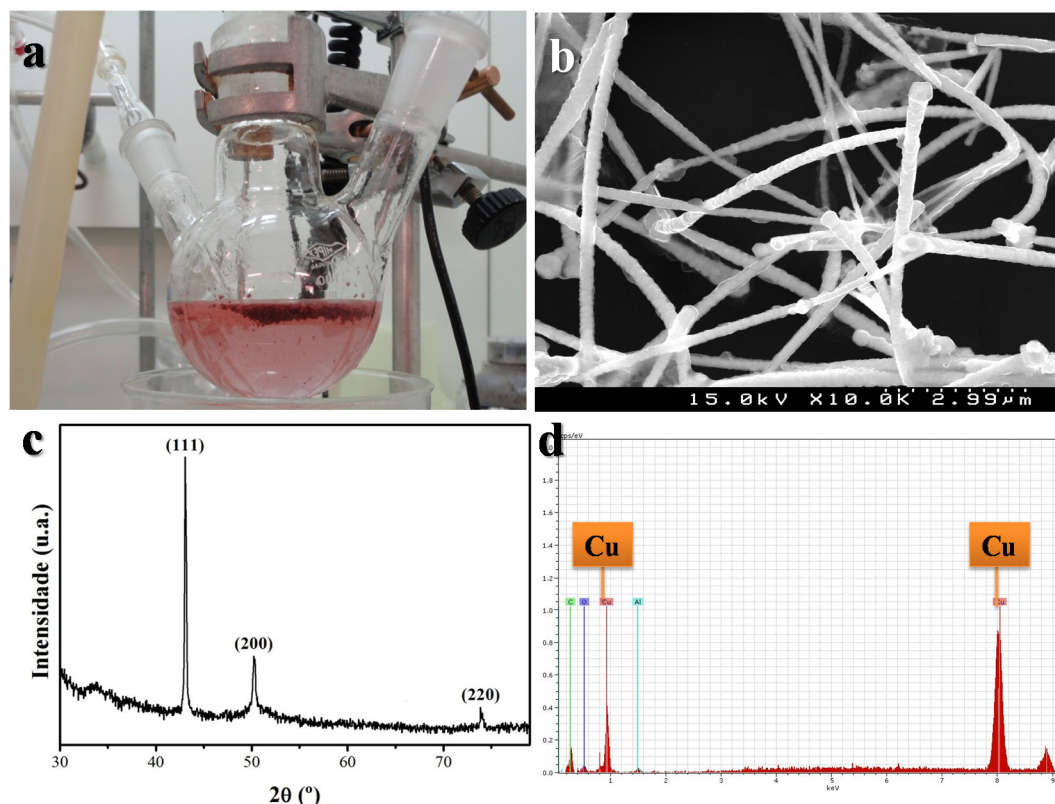
### 5.2.2 Preparação e caracterização de NFs de Cu e de nanocompósitos celulose/NFs Cu

Os resultados apresentados mostraram que a incorporação das NPs de Cu designadamente na CB retarda a sua oxidação, no entanto para tempos de exposição ao ar prolongados verifica-se a sua oxidação. Devido a este facto, outra estratégia foi investigada de modo a obter nanocompósitos celulose/cobre quimicamente estáveis relativamente à oxidação. A metodologia seguida foi a alteração da reatividade química das NPs através da modificação da sua forma, utilizando-se nomeadamente NFs de Cu (Figura 5.10).

Os NFs de Cu foram obtidos através de redução em meio aquoso com uma transformação praticamente quantitativa, de acordo com o descrito por Chang *et al.* [49]. A formação de cobre metálico através deste método é baseada na seguinte equação de redução do complexo de cobre(II) em meio alcalino.



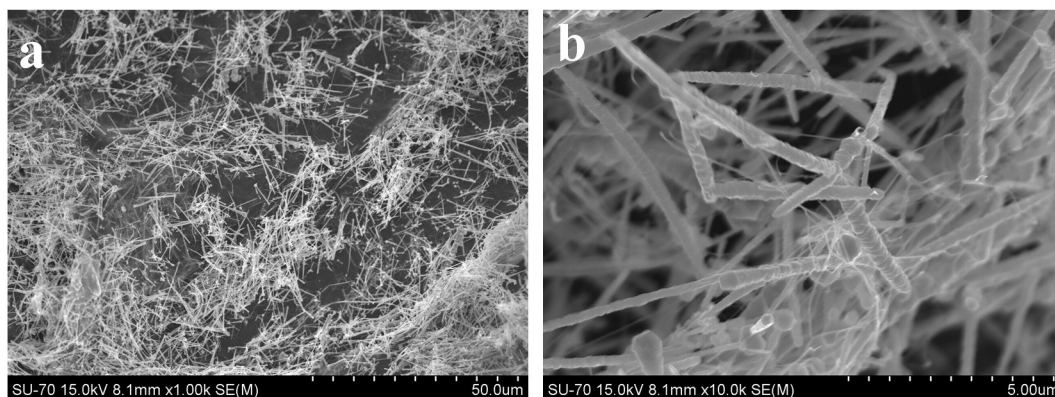
A obtenção do cobre metálico foi sugerida pelo desaparecimento da cor azul clara dos complexos de cobre(II) (por exemplo  $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^{2-}$ ,  $[\text{Cu}(\text{En})(\text{OH})_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{En})_2]^{2+}$ ). Como se pode observar na figura 5.10a, os NFs de Cu com diâmetros na gama de 90-220 nm e com comprimentos na ordem dos micrómetros permanecem no topo da mistura reacional.



**Figura 5.10** – Fotografia digital dos NFs de Cu após a síntese (a), imagem de SEM (b), difratograma de raios X (c) e respetivo espectro de EDX (d) dos NFs de Cu.

Os NFs de Cu (estrutura cúbica de faces centradas [50] - Figura 5.10c) foram incorporados nas matrizes celulósicas através da colocação das matrizes na solução aquosa de NFs e deixando-se a mistura em agitação. No entanto através desta metodologia *ex situ*, na CB os NFs ficaram amarrados na superfície da matriz (Figura 5.11a) enquanto na CV não houve qualquer ligação.

Este facto poderá ser consequência do diferente tipo de morfologia das matrizes e da sua capacidade para dar origem a misturas compactas com estruturas unidimensionais relativamente longas como os NFs de Cu. No caso da CB, este processo é facilitado por pequenas nanofibrilas que se vão deslaçando da matriz e “enrolando” os NFs, originando uma estrutura tipo rede, como pode ser observado detalhadamente na Figura 5.11b.



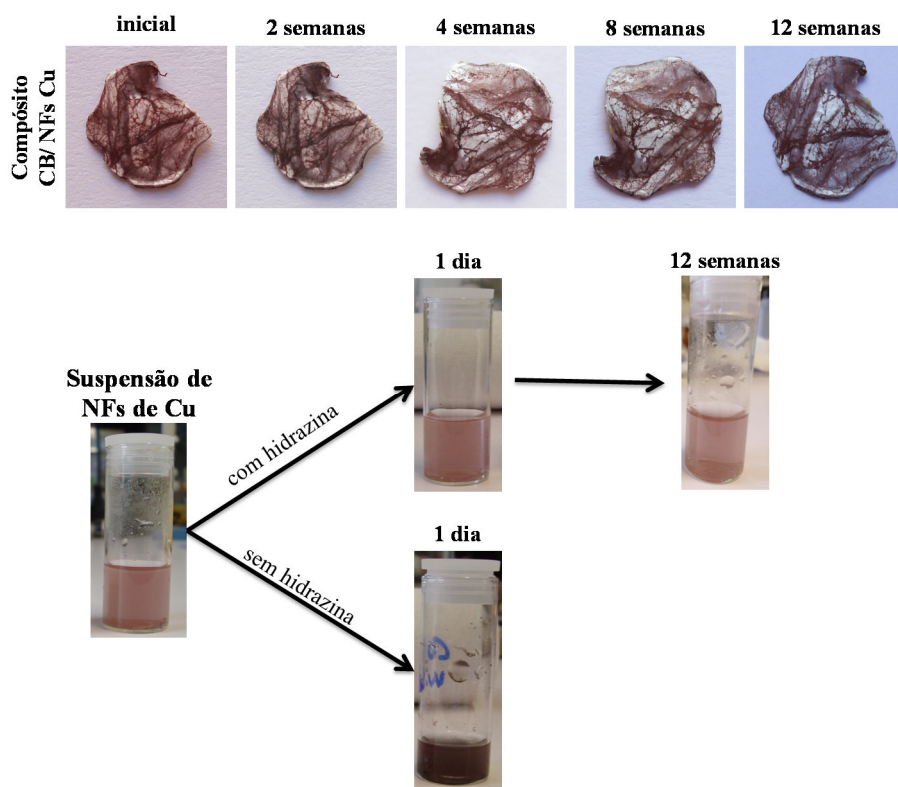
**Figura 5.11** – Imagens de SEM do composto CB/NFs Cu.

Apesar dos compósitos CB/NFs Cu evidenciarem ligeira oxidação quando expostos ao ar, este processo não é extenso e rápido como o observado para as NPs de Cu e nanocompósitos CB/NPs Cu. Esta observação é evidente através da análise da cor (Figura 5.12), espectros óticos (Figura 5.13) e difração de raios X (Figura 5.15b) dos nanocompósitos CB/NFs Cu quando expostos ao ar.

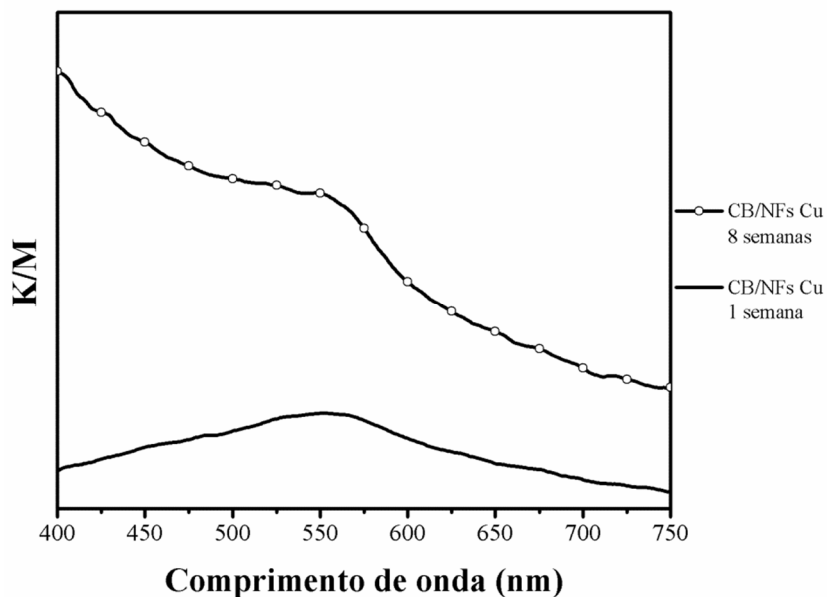
Através da análise da Figura 5.12 é visível que no caso do nanocompósitos CB/NFs de Cu, a cor não varia significativamente com o tempo de exposição ao ar, contrastando com o observado para os compósitos análogos com NPs de Cu. A solução aquosa dos NFs de Cu não ficou transparente após 1 dia de exposição ao ar como se verificou para a solução de NPs de Cu. Neste caso, a adição de 1 gota de hidrazina é suficiente para a cor da suspensão se manter durante várias semanas. É de salientar que no caso dos nanocompósitos CB/NFs Cu não se adicionou hidrazina, e mantiveram a coloração inicial durante várias semanas.

A Figura 5.13 mostra o espectro ótico dos compósitos CB/NFs para tempos distintos de exposição ao ar. A maior diferença no espectro destes compósitos, antes e após a exposição ao ar, verifica-se na região espectral entre os 400 e 500 nm sendo consequência provável da oxidação dos NFs de Cu.

A banda de SPR das nanoestruturas de Cu é especialmente sensível ao tamanho e forma de partícula e à constante dielétrica do meio [51]. No entanto no espectro ótico dos compósitos CB/NFs Cu, e contrariamente ao que foi observado para os compósitos CB/NPs Cu, observa-se a banda SPR característica dos NFs de Cu ( $\lambda_{\text{máx}} = 552 \text{ nm}$ ), oito semanas após a sua preparação.



**Figura 5.12** – Fotografias digitais da suspensão aquosa dos NFs de Cu e do respectivo compósito com CB para tempos distintos de exposição ao ar.

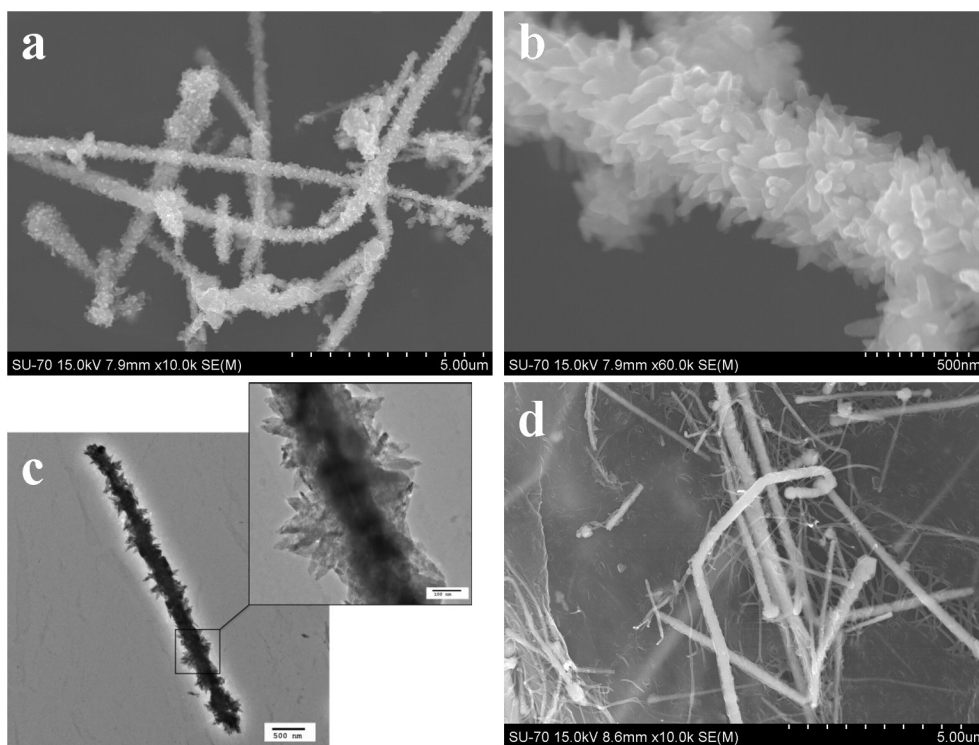


**Figura 5.13** – Espectros óticos (função Kubelka/Munk) dos compósitos CB/NFs Cu para tempos distintos de exposição ao ar.

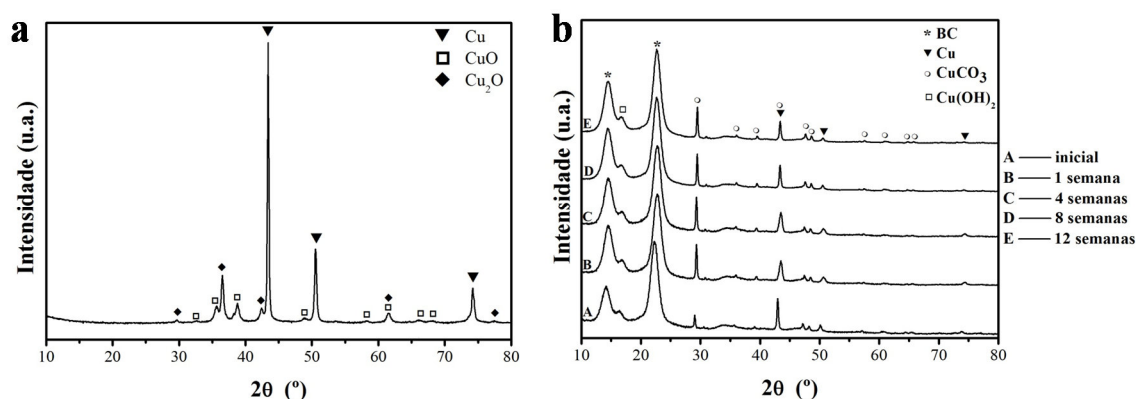


Este processo de oxidação no caso dos NFs de Cu secos e expostos ao ar é bastante rápido quando comparado com o nanocompósito de CB correspondente. As imagens de SEM (Figura 5.14a e Figura 5.14b) mostram que os NFs secos formam uma camada de cristalites na sua superfície identificadas por XRD como uma mistura de óxidos de cobre (Figura 5.15a). Através da análise de TEM confirmou-se a formação deste tipo de revestimento devido à oxidação da superfície dos NFs de Cu em cristalites que cresceram na forma de espinhos (Figura 5.14c). A imagem SEM do compósito CB/NFs Cu exposto às mesmas condições (Figura 5.14d) mostrou que os NFs de Cu na sua superfície apresentam uma deterioração menor e com uma textura distinta. Este facto é devido à formação de um filme fino de  $\text{CuCO}_3$  e  $\text{Cu(OH)}_2$ , como observado anteriormente para o compósito CB/NPs Cu, tal como confirmado por XRD (Figura 5.15b). No entanto, e ao contrário dos resultados obtidos para os nanocompósitos CB/NPs Cu, o difratograma de raios X para os compósitos CB/NFs Cu mostra os picos do cobre metálico mesmo após um período prolongado de exposição ao ar. Este facto vem confirmar a análise dos espectros óticos dos nanocompósitos para tempos distintos de exposição ao ar.

Estas observações confirmam a hipótese já demonstrada que a CB possui capacidade de limitar a oxidação das nanoestruturas de Cu sendo por isso um substrato mais adequado para a síntese de nanocompósitos celulósicos contendo este metal, relativamente à CV.



**Figura 5.14** – Imagens de SEM e TEM dos NFs de Cu secos e após 3 dias de exposição ao ar (a, b e c) e do compósito CB/NFs Cu após 5 meses de exposição ao ar (d).



**Figura 5.15** – Difratoograma de raios X dos NFs de Cu após 3 dias de exposição ao ar (a) e do nanocompósito CB/NFs Cu para tempos distintos de exposição ao ar (b).

### 5.3. Estudos de atividade antibacteriana em nanocompósitos celulose/Cu

Para avaliar a atividade antibacteriana dos nanocompósitos celulose/Cu realizou-se um estudo em alguns dos materiais sintetizados. Pretendeu-se deste modo analisar o efeito do substrato celulósico usado, a quantidade de Cu e o efeito da morfologia. A tabela 5.1 descreve as amostras estudadas assim como o seu teor final em Cu determinado por análise elementar.

**Tabela 5.1** – Nanocompósitos celulose/Cu analisados e correspondente teor final em cobre.

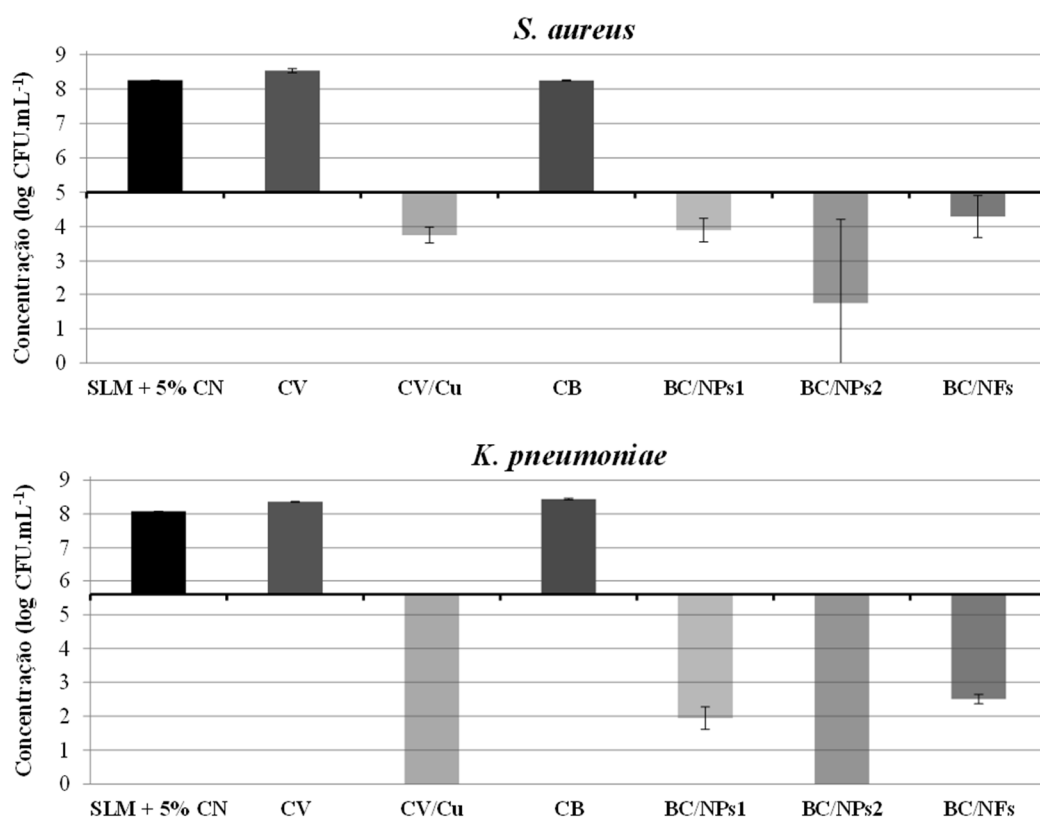
Substrato	Referência	Cu (% m/m)
CV	CV	-
	CV/Cu	0,55
CB	CB	-
	CB/NPs1	0,93
	CB/NPs2	4,95
	CB/NFs	5,17

Como descrito no capítulo 2, os nanocompósitos foram colocados em contacto com as suspensões de bactérias durante 24 h, sendo adotadas condições de ensaio com crescimento de bactérias.

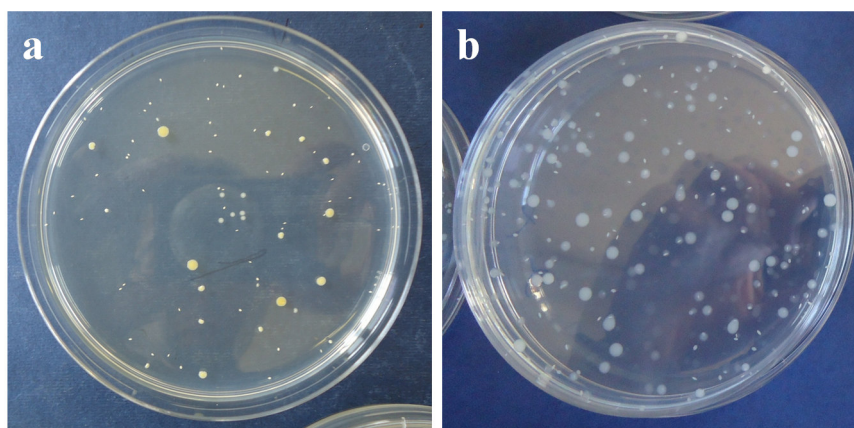
A Figura 5.16 apresenta os resultados obtidos para atividade antibacteriana dos nanocompósitos preparados em relação a duas bactérias distintas, nomeadamente a *S. aureus* e a *K. pneumoniae* (Figura 5.17), sendo a CV e a CB testadas como amostras de controlo. Através da



análise dos gráficos verifica-se que, para ambas as bactérias, as amostras de controlo não apresentam atividade antibacteriana para as condições testadas (valor da concentração praticamente idêntico à suspensão líquida microbiana – SLM).



**Figura 5.16** – Atividade antibacteriana das amostras de controlo e dos nanocompósitos com Cu (nanoesferas ou NFs) contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*.



**Figura 5.17** – Fotografias digitais de placas de agar inoculadas com *S. aureus* e *K. pneumoniae* após 24 h.

No caso da *S. aureus* observou-se que a amostra BC/NPs2 apresenta maior atividade bactericida tendo os outros nanocompósitos atividades semelhantes entre si. Esta análise mostrou claramente a importância do teor da carga inorgânica na atividade antibacteriana, semelhante ao verificado no caso dos nanocompósitos com Ag. Através da observação dos dados obtidos para as amostras com NPs Cu (BC/NPs1 e BC/NPs2), o aumento do teor de Cu de 0,93% para 4,95% resultou num aumento significativo do efeito bactericida. O aumento da eficiência bactericida em função do teor de Cu está de acordo com o verificado na literatura para compósitos de Cu em fibras CV com quitosano, em testes de halo contra a *E. coli* [31]. A atividade antibacteriana das nanoestruturas de Cu é atribuída à libertação de iões  $\text{Cu}^{2+}$ . No caso da *K. pneumoniae* foi observada uma melhoria da eficiência com o aumento do teor de Cu indicando que o efeito é semelhante em ambos os tipos de bactérias usadas.

No entanto, apesar da amostra com teor mais elevado de Cu ser a BC/NFs, este nanocompósito não apresenta maior atividade antibacteriana. Este facto permitiu concluir que para o cobre, o efeito bactericida depende da morfologia das NPs. Visto o efeito antibacteriano das NPs de Cu em solução ser atribuído à libertação de iões, no caso dos nanocompósitos com NFs esta libertação poderá ser menor justificando assim a menor eficiência.

Outro aspeto a referir é o efeito da matriz celulósica na atividade antibacteriana. No caso da *S. aureus* a amostra CV/Cu apresenta uma atividade similar à do nanocompósito BC/NPs1 (teor de Cu no CV/Cu é praticamente metade do obtido no nanocompósito BC/NPs1), no entanto, para a *K. pneumoniae*, o nanocompósito preparado na matriz de CV apresenta um efeito bactericida superior. A deposição superficial aliada à estrutura mais aberta da matriz de CV pode favorecer a maior libertação de iões Cu no nanocompósito com a CV, justificando a sua atividade antibacteriana. A maior libertação de iões metálicos em solução dos nanocompósitos com base na CV foi observada também no caso dos nanocompósitos celulose/Ag descritos no capítulo 2 (ponto 2.4).

## 5.4. Conclusões

Foram descritas estratégias distintas, nomeadamente *in situ* e *ex situ*, para preparar uma série de nanocompósitos celulósicos com nanoestruturas de cobre. Estas abordagens foram avaliadas através da variação do tipo de matriz celulósica usada (celulose vegetal ou bacteriana) e da morfologia das nanoestruturas usadas como cargas (esferas ou fios). A estabilidade química das nanoestruturas de Cu foi monitorizada através de técnicas como a espectroscopia ótica, difração de raios X e microscopia (varrimento e transmissão) permitindo o estudo da sua oxidação em matrizes celulósicas distintas.

Apesar da reatividade superficial intrínseca das estruturas de cobre para formar espécies oxidadas, as fibras de celulose têm um claro efeito na extensão da sua oxidação. É de notar que as fibras de CB apresentam um efeito mais acentuado no retardar da oxidação em relação às fibras de CV que poderá dever-se principalmente à sua estrutura nanofibrilar.

Os nanocompósitos celulose/Cu, de forma idêntica ao observado para os análogos com Ag, apresentaram atividade antibacteriana. A eficiência bactericida destes materiais revelou-se dependente de diversos fatores nomeadamente do teor de Cu, da morfologia das NPs e do tipo de matriz celulósica usada.

Entre as metodologias usadas para obter nanocompósitos celulose/Cu, o uso da CB em conjunto com os NFs de Cu mostrou ser a que origina materiais com melhor estabilidade química ao nível da resistência à oxidação e quando expostos às condições ambiente. Para estas condições, os nanocompósitos são estáveis durante períodos de tempo prolongados, tornando-os bastante interessantes para o fabrico de materiais à base de cobre para aplicação antibacteriana ou em papel eletrónico.

## 5.5. Referências

- [1] Kikelbick G. Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale. *Prog. Polym. Sci.* **2003** 28, 83-114.
- [2] Thomas V, Namdeo M, Mohan YM, Bajpai SK, Bajpai M. Review on polymer, hydrogel and microgel metal nanocomposites: A facile nanotechnological approach. *J. Macromol. Sci. Part A-Pure Appl. Chem.* **2008** 45, 107-119.
- [3] Requejo-Isidro J, del Coso R, Solis J, Gonzalo J, Afonso CN. Role of surface-to-volume ratio of metal nanoparticles in optical properties of Cu : Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite films. *Appl. Phys. Lett.* **2005** 86.
- [4] Kanninen P, Johans C, Merta J, Kontturi K. Influence of ligand structure on the stability and oxidation of copper nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2008** 318, 88-95.
- [5] Cuenya BR. Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. *Thin Solid Films* **2010** 518, 3127-3150.
- [6] Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007** 12, 527-534.
- [7] Kamat PV, Meisel D. Nanoparticles in advanced oxidation processes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2002** 7, 282-287.
- [8] Park BK, Jeong S, Kim D, Moon J, Lim S, Kim JS. Synthesis and size control of monodisperse copper nanoparticles by polyol method. *J. Colloid Interface Sci.* **2007** 311, 417-424.
- [9] Zhu HT, Zhang CY, Yin YS. Novel synthesis of copper nanoparticles: influence of the synthesis conditions on the particle size. *Nanotechnology* **2005** 16, 3079-3083.
- [10] Song XY, Sun SX, Zhang WM, Yin ZL. A method for the synthesis of spherical copper nanoparticles in the organic phase. *J. Colloid Interface Sci.* **2004** 273, 463-469.
- [11] Long Quoc P, Sohn JH, Kim CW, Park JH, Kang HS, Lee BC, et al. Copper nanoparticles incorporated with conducting polymer: Effects of copper concentration and surfactants on the stability and conductivity. *J. Colloid Interface Sci.* **2012** 365, 103-109.
- [12] Guillot S, Chemelli A, Bhattacharyya S, Warmont F, Glatter O. Ordered Structures in Carboxymethylcellulose-Cationic Surfactants-Copper Ions Precipitated Phases: in Situ Formation of Copper Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2009** 113, 15-23.
- [13] Cady NC, Behnke JL, Strickland AD. Copper-Based Nanostructured Coatings on Natural Cellulose: Nanocomposites Exhibiting Rapid and Efficient Inhibition of a Multi-Drug Resistant Wound Pathogen, *A. baumannii*, and Mammalian Cell Biocompatibility In Vitro. *Adv. Funct. Mater.* **2011** 21, 2506-2514.

- [14] Gamarra D, Munuera G, Hungría AB, Fernández-García M, Conesa JC, Midgley PA, et al. Structure–Activity Relationship in Nanostructured Copper–Ceria-Based Preferential CO Oxidation Catalysts. *J. Phys. Chem. C* **2007** *111*, 11026-11038.
- [15] Huang HH, Yan FQ, Kek YM, Chew CH, Xu GQ, Ji W, et al. Synthesis, characterization, and nonlinear optical properties of copper nanoparticles. *Langmuir* **1997** *13*, 172-175.
- [16] Loo BH, Lee YG, Liang EJ, Kiefer W. Surface-enhanced Raman scattering from ferrocyanide and ferricyanide ions adsorbed on silver and copper colloids. *Chem. Phys. Lett.* **1998** *297*, 83-89.
- [17] Dhas NA, Raj CP, Gedanken A. Synthesis, characterization, and properties of metallic copper nanoparticles. *Chem. Mater.* **1998** *10*, 1446-1452.
- [18] Qi LM, Ma JM, Shen JL. Synthesis of copper nanoparticles in nonionic water-in-oil microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **1997** *186*, 498-500.
- [19] Liu ZW, Bando Y. A novel method for preparing copper nanorods and nanowires. *Adv. Mater.* **2003** *15*, 303-305.
- [20] Yeh MS, Yang YS, Lee YP, Lee HF, Yeh YH, Yeh CS. Formation and characteristics of Cu colloids from CuO powder by laser irradiation in 2-propanol. *J. Phys. Chem. B* **1999** *103*, 6851-6857.
- [21] Yeh YH, Yeh MS, Lee YP, Yeh CS. Formation of Cu nanoparticles from CuO powder by laser ablation in 2-propanol. *Chem. Lett.* **1998** 1183-1184.
- [22] Park YS, Chae HK. Geometric Control and Intense Plasmon Resonances of Colloidal Truncated Triangular Copper Nanoplates in Nonionic Microemulsions Containing Tetrabutylammonium Hydroxide. *Chem. Mater.* **2010** *22*, 6280-6290.
- [23] Pinto RJB, Neves MC, Pascoal Neto C, Trindade T. Growth and chemical stability of copper nanostructures on cellulosic fibers. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012** DOI: 10.1002/ejic.201200605.
- [24] Koenigsmann C, Zhou WP, Adzic RR, Sutter E, Wong SS. Size-Dependent Enhancement of Electrocatalytic Performance in Relatively Defect-Free, Processed Ultrathin Platinum Nanowires. *Nano Lett.* **2010** *10*, 2806-2811.
- [25] Koenigsmann C, Santulli AC, Gong K, Vukmirovic MB, Zhou W-p, Sutter E, et al. Enhanced Electrocatalytic Performance of Processed, Ultrathin, Supported Pd–Pt Core–Shell Nanowire Catalysts for the Oxygen Reduction Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2011** *133*, 9783-9795.
- [26] Huang Y-F, Shih H-S, Lin C-W, Xu P, Williams DJ, Ramos KJ, et al. Morphology Control of Cu Crystals on Modified Conjugated Polymer Surfaces. *Cryst. Growth Des.* **2012** *12*, 1778-1784.
- [27] Bruzewicz DA, Reches M, Whitesides GM. Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Anal. Chem.* **2008** *80*, 3387-3392.
- [28] Bracher PJ, Gupta M, Whitesides GM. Patterning precipitates of reactions in paper. *J. Mater. Chem.* **2010** *20*, 5117-5122.

- [29] Kotelnikova N, Vainio U, Pirkkainen K, Serimaa R. Novel approaches to metallization of cellulose by reduction of cellulose-incorporated copper and nickel ions. *Macromol. Symp.* **2007** 254, 74-79.
- [30] Vainio U, Pirkkalainen K, Kisko K, Goerigk G, Kotelnikova NE, Serimaa R. Copper and copper oxide nanoparticles in a cellulose support studied using anomalous small-angle X-ray scattering. *Eur. Phys. J. D* **2007** 42, 93-101.
- [31] Mary G, Bajpai SK, Chand N. Copper (II) Ions and Copper Nanoparticles-Loaded Chemically Modified Cotton Cellulose Fibers with Fair Antibacterial Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009** 113, 757-766.
- [32] Li Q, Yao G, Zeng X, Jing Z, Huo Z, Jin F. Facile and Green Production of Cu from CuO Using Cellulose under Hydrothermal Conditions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012** 51, 3129-3136.
- [33] Magdassi S, Grouchko M, Kamysny A. Copper Nanoparticles for Printed Electronics: Routes Towards Achieving Oxidation Stability. *Materials* **2010** 3, 4626-4638.
- [34] Pinto RJB, Marques PAAP, Neto CP, Trindade T, Daina S, Sadocco P. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. *Acta Biomater.* **2009** 5, 2279-2289.
- [35] Pinto RJB, Marques PAAP, Barros-Timmons AM, Trindade T, Neto CP. Novel SiO<sub>2</sub>/cellulose nanocomposites obtained by in situ synthesis and via polyelectrolytes assembly. *Compos. Sci. Technol.* **2008** 68, 1088-1093.
- [36] Pinto RJB, Marques PAAP, Martins MA, Neto CP, Trindade T. Electrostatic assembly and growth of gold nanoparticles in cellulosic fibres. *J. Colloid Interface Sci.* **2007** 312, 506-512.
- [37] Goncalves G, Marques PAAP, Pinto RJB, Trindade T, Pascoal Neto C. Surface modification of cellulosic fibres for multi-purpose TiO<sub>2</sub> based nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **2009** 69, 1051-1056.
- [38] Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. *Biomaterials* **2006** 27, 145-151.
- [39] Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2005** 44, 3358-3393.
- [40] Mott D, Galkowski J, Wang LY, Luo J, Zhong CJ. Synthesis of size-controlled and shaped copper nanoparticles. *Langmuir* **2007** 23, 5740-5745.
- [41] He JH, Kunitake T, Nakao A. Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. *Chem. Mater.* **2003** 15, 4401-4406.

- [42] Pinto RJB, Neves M, Pascoal Neto C, Trindade T. Composites of cellulose and metal nanoparticles. In: Ebrahimi F, editor. *Composites – New Trends and Developments*. Rijeka, Croatia: InTech; **2012**. p. 73-96.
- [43] Marques P, Nogueira HIS, Pinto RJB, Neto CP, Trindade T. Silver-bacterial cellulosic sponges as active SERS substrates. *J. Raman Spectrosc.* **2008** 39, 439-443.
- [44] Oh SY, Yoo DI, Shin Y, Kim HC, Kim HY, Chung YS, et al. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **2005** 340, 2376-2391.
- [45] Barud HS, Ribeiro CA, Crespi MS, Martines MAU, Dexpert-Ghys J, Marques RFC, et al. Thermal characterization of bacterial cellulose-phosphate composite membranes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2007** 87, 815-818.
- [46] ICDD PDF4+2011 Arquivo de difração de pós N°. 01-086-2340.
- [47] ICDD PDF4+2011 Arquivo de difração de pós N°. 04-010-1369.
- [48] Sokolnicki AM, Fisher RJ, Harrah TP, Kaplan DL. Permeability of bacterial cellulose membranes. *J. Membr. Sci.* **2006** 272, 15-27.
- [49] Chang Y, Lye ML, Zeng HC. Large-scale synthesis of high-quality ultralong copper nanowires. *Langmuir* **2005** 21, 3746-3748.
- [50] ICDD PDF4+2011 Arquivo de difração de pós N°. 03-065-9743.
- [51] Duan JL, Cornelius TW, Liu J, Karim S, Yao HJ, Picht O, et al. Surface Plasmon Resonances of Cu Nanowire Arrays. *J. Phys. Chem. C* **2009** 113, 13583-13587.





## *CAPÍTULO 6*

### ***CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS***

Neste trabalho foram preparados materiais compósitos com base em diferentes biopolímeros e NPs metálicas, nomeadamente Ag, Au e Cu, recorrendo a diversas estratégias preparativas. Os biopolímeros estudados (CV, CB, quitosano e pululano) mostraram ser matrizes eficientes na preparação de nanocompósitos, permitindo verificar que a aplicabilidade destas matrizes pode ser alargada a novas aplicações que não apenas as tradicionais.

A linha de investigação deste trabalho ao nível das aplicações foi focada na atividade antimicrobiana dos materiais preparados. Atendendo aos resultados obtidos, prevê-se que o uso destes bionanocompósitos possa ser promissor na produção de uma ampla gama de materiais interessantes onde a atividade antimicrobiana seja essencial. Estes novos materiais antimicrobianos poderão ser mais seguros e baratos em relação a alguns dos existentes atualmente, que acabam por ser tóxicos e irritantes para o ser humano. No entanto, devido às características específicas dos biopolímeros e do tipo de NPs usadas, outras áreas de investigação poderão ser estudadas no futuro. Alguns exemplos dessa possibilidade são as propriedades óticas no caso das NPs de Au e Ag e as propriedades condutoras no caso das NPs de Cu. Este facto acaba por ampliar ainda mais as possibilidades práticas do uso de materiais baseados em biopolímeros.

O estudo desenvolvido demonstrou que o método usado na preparação dos nanocompósitos influencia as propriedades finais apresentadas pelos materiais, sejam elas óticas ou antimicrobianas. Características como o tamanho, a forma, a aglomeração das NPs e o teor de carga inorgânica nos bionanocompósitos revelaram-se relevantes. No caso dos nanocompósitos celulose/Ag, estudos futuros deverão focar o uso de distintas metodologias preparativas, no entanto, devido ao teor de Ag ser o fator que mais influencia a atividade antibacteriana, terão de ser usadas amostras com teores semelhantes. Atendendo às preocupações atuais com a libertação e possível acumulação de iões Ag(I), tanto em células humanas como no ambiente, a cinética de libertação de Ag(I) pelos distintos materiais deverá ser estudada.

O trabalho desenvolvido especificamente com o quitosano e respetivos derivados demonstrou que a modificação química acaba por ser uma abordagem simples e rápida. Esta modificação pode ser usada para melhorar a compatibilidade com as NPs, ajudar a obter uma dispersão mais homogénea das NPs na matriz ou mesmo melhorar as propriedades finais obtidas.

O uso do pululano é um exemplo da procura de biopolímeros pouco referenciados na literatura e que podem ser usados na preparação de materiais interessantes em diversas aplicações. O estudo da sua atividade antifúngica foi bastante importante pois focou uma aplicação normalmente menos estudada dentro da atividade antimicrobiana. Este facto acabou por ajudar a compreender mecanismos subjacentes à atividade das NPs a nível dos fungos, tentando-se relacionar esse efeito com o verificado por exemplo em bactérias. Neste tipo de aplicação outros

estudos poderão ser realizados de modo a verificar até que ponto os fungos poderão ganhar resistência às NPs. A investigação realizada com estes filmes para revestimento de embalagens com frutos demonstrou o interesse prático destes materiais, no entanto estudos sistemáticos neste campo deverão ser efetuados no futuro.

O trabalho realizado com as NPs de cobre confirmou, como esperado, que além da prata este metal também pode ser usado para obter materiais com propriedades antimicrobianas. Para além disso mostrou que no caso de cobre a sua elevada tendência para oxidar sob condições ambiente acaba por ser um fator que limita efetivamente o uso deste metal. Este estudo, dando enfoque a uma propriedade química poucas vezes referenciada, ou mesmo omitida em artigos de especialidade, como é a oxidação dos materiais à base de cobre, permitiu evidenciar a importância do substrato usado mas ao mesmo tempo da morfologia de partícula. Este facto ajudará no desenvolvimento de novos materiais baseados em nanoestruturas de Cu ajudando a desenvolver novas metodologias que consigam evitar/retardar a oxidação, abrindo novas perspectivas em diferentes áreas nomeadamente ao nível de papel eletrónico.

Este estudo contribuiu para um maior conhecimento científico de materiais bionanocompósitos sendo previsível que ajude na criação de uma plataforma integrada de investigação, formação e transferência de tecnologia entre a área dos materiais derivados de fontes renováveis e a área da nanotecnologia. Atendendo à conjectura atual, justifica-se o desenvolvimento urgente de saberes no cruzamento destas áreas científicas. Contudo, outros contributos terão que ser dados e necessitam de ser desenvolvidos. Por exemplo, sabendo que as NPs (nomeadamente as de prata) são cada vez mais usadas como agentes antimicrobianos em aplicações diárias, mais estudos experimentais são necessários para tentar compreender o seu impacto ambiental. Do mesmo modo o mecanismo exato de interação das NPs com as diversas células (microbianas ou humanas) será um passo importante para perceber de que modo estas nanoestruturas provocam a sua inibição/morte. Estas são algumas questões que permitirão uma melhor compreensão da eficácia antimicrobiana e respetiva segurança, não só destes materiais, mas dos existentes atualmente no mercado.



## *CAPÍTULO 7*

## ***PARTE EXPERIMENTAL***

## CAPÍTULO 7 – PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Materiais e reagentes.....	168
7.1.1 Biopolímeros .....	168
7.1.2 Reagentes .....	169
7.2 Procedimentos experimentais das sínteses químicas .....	170
7.2.1 Síntese das NPs de Ag .....	170
7.2.1.1 Redução do $\text{Ag}^+$ com borohidreto de sódio.....	170
7.2.1.2 Redução do $\text{Ag}^+$ com citrato de sódio.....	170
7.2.2 Preparação <i>in situ</i> dos nanocompósitos celulose/Ag .....	170
7.2.2.1 Redução do $\text{Ag}^+$ com borohidreto de sódio.....	170
7.2.2.2 Redução do $\text{Ag}^+$ sob radiação UV.....	171
7.2.3 Pós-deposição de NPs de Ag.....	171
7.2.3.1 Preparação através da metodologia LbL.....	171
7.2.3.2 Difusão das NPs de Ag para as membranas de BC.....	172
7.2.4 Estudo da libertação de Ag(I) pelos nanocompósitos celulose/Ag.....	172
7.2.5 Preparação de filmes compósitos quitosano/NPs metálicas .....	172
7.2.5.1 Filmes quitosano/Ag .....	172
7.2.5.2 Filmes quitosano/Au .....	172
7.2.6 Preparação de filmes compósitos pululano/Ag.....	173
7.2.7 Preparação de nanoestruturas de Cu e dos nanocompósitos celulose/Cu.....	173
7.2.7.1 Preparação das NPs de Cu .....	173
7.2.7.2 Preparação dos NFs de Cu .....	173
7.2.7.3 Preparação dos nanocompósitos celulose/Cu.....	174
7.3 Culturas e meios de cultura para os ensaios antibacterianos .....	174
7.4 Ensaios antimicrobianos de nanocompósitos .....	175
7.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana dos nanocompósitos celulose/Ag, quitosano/Ag e celulose/Cu.....	175

7.4.2 Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana dos nanocompósitos CH/Ag (teste de halo).....	176
7.4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos nanocompósitos pululano/Ag.....	177
7.4.4 Estudo da atividade antifúngica dos nanocompósitos PL/Ag como material de embalagem de frutos.....	177
7.5 Técnicas e métodos de caracterização instrumental.....	178
7.5.1 Difração de raios X de pós (XRD).....	178
7.5.2 Dispersão dinâmica de luz (DLS).....	178
7.5.3 Espectrometria de emissão atômica por ICP.....	178
7.5.4 Espectrometria de RMN $^1\text{H}$ .....	178
7.5.5 Espectroscopia de UV-Vis.....	179
7.5.6 Espectroscopia vibracional.....	179
7.5.7 Medição da espessura dos filmes.....	179
7.5.8 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e de varrimento em transmissão (STEM) de alta resolução.....	179
7.5.9 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	180
7.5.10 Microscopia de força atômica (AFM).....	180
7.6 Referências.....	181

## 7.1 Materiais e reagentes

### 7.1.1 Biopolímeros

#### *Celulose*

As fibras de celulose vegetal (*Eucalyptus globulus*), pasta kraft branqueada EFC (comprimento médio de 0,9 mm e largura média de 20  $\mu\text{m}$ ), compostas essencialmente por celulose (~85%) e glucuronoxilanas (~15%) foram fornecidas pela Portucel (Portugal) tendo sido desintegradas e lavadas com água destilada antes da sua utilização. Para cada síntese foi utilizada uma consistência de 1% (1g de celulose/ 100 mL água).

A celulose bacteriana pura formada pela *Acetobacter xylinus* foi recebida na forma de uma rede tridimensional molhada (estruturas nanofibrilares com 50-100 nm de largura). Para as sínteses realizadas com celulose bacteriana foram utilizadas amostras com dimensão de 2x2  $\text{cm}^2$ . No final das sínteses as amostras foram liofilizadas.

#### *Quitosano*

As amostras de quitosano foram cedidas pela Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (Índia) e purificadas antes de usar. O grau de desacetilação determinado por RMN  $^1\text{H}$  usando 1% de  $\text{CD}_3\text{COOD}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  foi de 97% [1]. A massa molecular relativa obtida usando uma solução de 0,3 M  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ / 0,2 M  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  a 25  $^\circ\text{C}$  foi de 350 000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  aplicando as constantes de Mark-Houwink [2].

O derivado quaternário de amónio solúvel em água (HTCCH) foi obtido por reação do quitosano com o cloreto de glicidiltrimetilamónio (GTMAC) seguindo o procedimento descrito por Seong *et al.*[3]. 5 g de CH purificado foi dissolvido em 250 mL de uma solução de ácido acético 1%, sendo posteriormente adicionado GTMAC (razão molar GTMAC/CH foi de 4/1), a solução ficou em agitação a 65  $^\circ\text{C}$  durante 24 h sob fluxo de  $\text{N}_2$ . O derivado HTCCH foi precipitado e lavado com etanol (EtOH). O grau de substituição deste derivado foi determinado a partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  seguindo um método previamente descrito, tendo sido obtido um valor de aproximadamente 30% [1].

O derivado alquilo de quitosano, *N*-dodecil quitosano, foi obtido por reação do quitosano com o dodecanal usando o cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) seguindo o procedimento descrito por Desbrières *et al.*[1]. 5 g de quitosano purificado foram dissolvidas em 250 mL de uma solução aquosa de ácido acético 1% sendo esta solução deixada 48 h sob agitação mecânica à temperatura ambiente. Após a dissolução completa do quitosano, foram adicionados 150 mL de



EtOH sendo o pH da mistura ajustado a 5 de modo a evitar a precipitação do quitosano. Após este passo foi adicionada uma solução de dodecan-1-ol em EtOH e de seguida adicionado o cianoborohidreto de sódio em excesso (3 moles por macromolécula de quitosano). A mistura foi deixada em agitação constante durante 24 h à temperatura ambiente. Após este período o derivado de quitosano DCH foi precipitado com EtOH sendo finalmente lavado várias vezes com misturas de EtOH/H<sub>2</sub>O, aumentando-se a percentagem de EtOH de 70 para 100 % v/v. Neste caso o grau de substituição foi de aproximadamente 30% sendo também determinado a partir do espectro por RMN <sup>1</sup>H.

### ***Pululano***

O pululano (98% e MW 272 kDa) foi adquirido ao grupo B&K Technology (China) e utilizado sem tratamento adicional.

## **7.1.2 Reagentes**

Os solventes e reagentes químicos utilizados no decorrer deste trabalho foram adquiridos a várias empresas e foram usados sem nenhuma purificação prévia.

### ***Reagentes***

Ácido acético glacial	Aldrich, 99,8%
Borohidreto de sódio	Riedel-de Haën, 95%
Cianoborohidreto de sódio	Aldrich, 95%
Citrato de sódio	BDH, 99%
Cloreto de glicidiltrimetilamónio	Fluka, 90%
Cloreto de sódio	Merck, p.a.
Dodecanal	Aldrich, 92%
Etilenodiamina	Aldrich, 99%
Glicerol	Sigma-Aldrich, 99,5%
Hidrogenotetracloro de ouro (III) trihidratado	Aldrich, 99,9%
Hidrazina hidratada	Sigma-Aldrich, 50-60%
Hidróxido de sódio	Acrôs Organics, 98,5%

Nitrato de cobre (II) trihidratado	RPE, p.a.
Nitrato de prata (I)	Aldrich, 99, 999%
Poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA)	Aldrich, 20 wt.% (MW 100 000 – 200 000)
Poli(4-estireno sulfonato de sódio) (PSS)	Aldrich, p.a. (MW 70,000)
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	Panreac, p.a.

## **7.2 Procedimentos experimentais das sínteses químicas**

### **7.2.1 Síntese das NPs de Ag**

#### **7.2.1.1 Redução do $\text{Ag}^+$ com borohidreto de sódio**

Coloides aquosos de Ag foram preparados por redução direta do  $\text{AgNO}_3$  com excesso de  $\text{NaBH}_4$ , adaptando o procedimento descrito na literatura para a síntese de NPs de Ag pelo método de Creighton [4]. A 240 mL de uma solução  $\text{NaBH}_4$  2 mM em banho de gelo e sob agitação vigorosa é adicionada, gota a gota, 80 mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$  1 mM. Após alguns minutos a solução adquire um tom amarelo sendo deixada em agitação durante mais 2 h.

#### **7.2.1.2 Redução do $\text{Ag}^+$ com citrato de sódio**

A síntese das NPs de Ag por este método foi realizada por redução do  $\text{AgNO}_3$  com citrato de sódio. Colocou-se 50 mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$  1 mM em ebulição durante 10 min. Após esse período adicionou-se 1 cm<sup>3</sup> de uma solução de citrato de sódio 1% (m/v) à solução de  $\text{AgNO}_3$ , sob agitação vigorosa, deixando-se a mistura em refluxo durante 45 min. Depois desse período deixou-se arrefecer lentamente a solução até à temperatura ambiente [5].

### **7.2.2 Preparação *in situ* dos nanocompósitos celulose/Ag**

#### **7.2.2.1 Redução do $\text{Ag}^+$ com borohidreto de sódio**

As NPs de Ag foram depositadas nas fibras de celulose por redução direta do  $\text{AgNO}_3$  com excesso de  $\text{NaBH}_4$ , adaptando o procedimento descrito no ponto 7.2.1.1 para a preparação de NPs

de Ag por redução com borohidreto de sódio. Tipicamente, a 240 mL de uma solução  $\text{NaBH}_4$  2 mM contendo as fibras de celulose em banho de gelo e sob agitação vigorosa foi adicionada, gota a gota, 80 mL de uma solução de  $\text{AgNO}_3$  1 mM. Após alguns minutos a solução fica com um tom amarelado, deixando-se durante mais 2 h em agitação. Após a preparação dos nanocompósitos estes foram lavados diversas vezes com água destilada. Os nanocompósitos com celulose vegetal foram secos numa estufa a 110 °C durante 24 horas enquanto os nanocompósitos com celulose bacteriana foram liofilizados. Para a preparação dos nanocompósitos com diferentes teores de Ag a concentração de  $\text{AgNO}_3$  foi variada entre 0,033 e 2 mM, mantendo-se a relação molar em relação ao  $\text{NaBH}_4$ .

#### 7.2.2.2 Redução do $\text{Ag}^+$ sob radiação UV

Os substratos de celulose foram imersos em 80 mL da solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (1mM) e expostos a radiação UV (lâmpada UV com  $\lambda = 254$  nm;  $P = 8$  W) durante tempos distintos de exposição (5 a 60 min). Após a síntese as fibras foram filtradas e lavadas diversas vezes com água destilada de modo a remover  $\text{AgNO}_3$  vestigial que possa ter ficado retido nas fibras. As fibras de celulose (CV e CB) foram secas de modo idêntico ao descrito no ponto 7.2.2.1.

### 7.2.3 Pós-deposição de NPs de Ag

Os colóides de Ag foram preparados a partir da redução do  $\text{AgNO}_3$  com  $\text{NaBH}_4$  como descrito no ponto 7.2.1.1 mas neste caso na ausência dos substratos celulósicos. Foram preparados colóides com distintos teores de Ag a partir do coloide inicial de Ag.

#### 7.2.3.1 Preparação através da metodologia LbL

A síntese dos nanocompósitos por LbL baseou-se num método descrito na literatura [6]. Foram preparadas soluções aquosas de PDDA e PSS a 1% (m/v) em NaCl (0,5 M). Num primeiro passo, as fibras de celulose vegetal foram imersas na solução de PDDA e deixadas em agitação durante aproximadamente 10 min. Após esse período, as fibras foram filtradas e lavadas com água desionizada de modo a remover o excesso de polieletrólito. Seguidamente as fibras foram imersas na solução de PSS e novamente na solução de PDDA, repetindo-se o procedimento seguido no primeiro passo (imersão e lavagem). Após este passo seguiu-se a imersão das fibras modificadas na solução coloidal de NPs de Ag preparadas anteriormente (10 min). O processo de secagem foi idêntico ao utilizado nas sínteses *in situ*.

#### **7.2.3.2 Difusão das NPs de Ag para as membranas de BC**

As membranas de BC foram imersas nas soluções de colóides de Ag anteriormente preparadas durante 24 h. Após este tempo de imersão os nanocompósitos preparados foram lavadas repetidamente com água destilada e secos por liofilização.

#### **7.2.4 Estudo da libertação de Ag(I) pelos nanocompósitos celulose/Ag**

Para o estudo da cinética de libertação de Ag dos nanocompósitos celulose/Ag foram utilizadas 100 mg no caso dos CV/Ag e 10 mg para os BC/Ag. Os nanocompósitos, em triplicado para cada tempo analisado, foram então individualmente imersos em 10 mL de uma solução salina fisiológica a 37 °C. Ao fim de 6, 24 e 48 h foram retirados 2 mL de cada solução e o teor de prata foi analisado por ICP.

#### **7.2.5 Preparação de filmes compósitos quitosano/NPs metálicas**

##### **7.3.5.1 Filmes quitosano/Ag**

As soluções de CH e do derivado anfifílico (1,5% m/v) foram preparadas através da dissolução dos respetivos biopolímeros em ácido acético (1% v/v). O HTCCH foi preparado de maneira similar, no entanto neste caso foi usada água destilada como solvente. Soluções aquosas dos colóides de Ag (20 mL) com diferentes teores foram adicionadas às soluções dos biopolímeros. As misturas foram homogeneizadas através de agitação mecânica durante 30 min e as suspensões obtidas foram desgaseificadas.

Os filmes de quitosano (modificado e não modificado) e dos nanocompósitos foram obtidos por evaporação do solvente. As suspensões foram colocadas numa estufa ventilada a 30 °C durante 24 h sendo usados pratos de acrílico (10 cm x 10 cm) como moldes. Os filmes foram retirados dos moldes e guardados num exsiccador.

##### **7.2.5.2 Filmes quitosano/Au**

Os filmes de quitosano/Au foram preparados do mesmo modo que os filmes quitosano/Ag. As NPs de Au foram preparadas por redução de um complexo de Au (III),  $[\text{AuCl}_4]^-$ , com citrato de sódio seguindo o procedimento descrito na literatura [7]. Tipicamente, 1,88 mL de uma solução

aquosa de citrato de sódio (0,085 M) foi adicionada a 100 mL de uma solução aquosa de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,24 mM) a 80 °C e sob agitação. Seguindo este procedimento obtém-se uma solução coloidal avermelhada estável durante longos períodos, tanto em água como em etanol.

### 7.2.6 Preparação de filmes compósitos pululano/Ag

Os coloides de Ag (10 mL) com diferentes teores foram adicionados a 30 mL da solução aquosa de pululano (9% m/v) sendo as misturas homogeneizadas através de agitação magnética durante 30 min. De modo a promover a plastificação dos filmes foi adicionado à mistura glicerol (15% em relação à quantidade de pululano). Os filmes foram obtidos de igual modo ao descrito para os nanocompósitos quitosano/NPs metálicas (ponto 7.2.5). Para fins comparativos foi preparado um filme contendo Ag iônica como descrito acima mas usando  $\text{AgNO}_3$  em vez dos coloides de Ag (a concentração de  $\text{AgNO}_3$  foi idêntica à usada na preparação dos coloides). Antes dos ensaios os filmes foram guardados num exsiccador.

### 7.2.7 Preparação de nanoestruturas de Cu e dos nanocompósitos celulose/Cu

#### 7.2.7.1 Preparação das NPs de Cu

As NPs coloidais de cobre foram preparadas por redução do sulfato de cobre (II) com borohidreto de sódio em meio alcalino através do método descrito por Loo *et al.* [8]. A 60 mL de uma solução aquosa de citrato de sódio ( $5 \times 10^{-3}$  M) adicionou-se 5 mL de uma solução aquosa de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \times 10^{-2}$  M). Esta solução foi colocada sob fluxo de  $\text{N}_2$  durante alguns minutos após os quais foram adicionados, gota a gota, 30 mL de  $\text{NaBH}_4$  ( $2 \times 10^{-2}$  M) e 30 mL de  $\text{NaOH}$  ( $2 \times 10^{-2}$  M) sob agitação vigorosa. A mistura foi mantida sob agitação e atmosfera de  $\text{N}_2$  durante 1 h.

#### 7.2.7.2 Preparação dos NFs de Cu

Os NFs de Cu foram preparados por redução do nitrato de cobre (II) com hidrazina em meio alcalino segundo o procedimento descrito por Chang *et al.* [9]. A 20 mL de  $\text{NaOH}$  (15 M) é adicionado 1 mL de uma solução aquosa de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,1 M). Esta solução foi mantida sob atmosfera de  $\text{N}_2$  e foi adicionado consecutivamente 150  $\mu\text{L}$  de etilenodiamina e 25  $\mu\text{L}$  de hidrazina. Após esta adição, a mistura foi colocada sob agitação vigorosa e a temperatura aumentada para 60 °C durante 1 h.

Seguindo este procedimento obtém-se uma solução avermelhada dos NFs que ficam em suspensão na mistura reacional. Os NFs foram então isolados por centrifugação e lavados com água destilada várias vezes de modo a remover possíveis reagentes que não tenham reagido.

#### **7.2.7.3 Preparação dos nanocompósitos celulose/Cu**

A síntese dos nanocompósitos celulose/NPs Cu foi realizada através do procedimento descrito para as NPs de Cu (ponto 7.2.7.1.) mas neste caso na presença das fibras celulósicas (vegetal e bacteriana). Inicialmente, as fibras são misturadas com a solução aquosa do sal de cobre (II) durante 1 h e após este período é adicionada a solução redutora à suspensão. Os nanocompósitos adquirem uma cor avermelhada após a redução completa do cobre (II). Foi preparado um nanocompósito partindo de uma concentração de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de 0,1 M (mantendo todas as concentrações dos outros reagentes) de modo a obter um nanocompósito com um teor de Cu superior.

Para os nanocompósitos celulose/NFs Cu, as fibras celulósicas (CV e CB) foram adicionadas a 20 mL da suspensão de NFs de Cu previamente preparada. A mistura foi mantida sobre agitação constante, à temperatura ambiente e sob atmosfera de  $\text{N}_2$ , durante 3 h.

Todos os nanocompósitos obtidos foram posteriormente recolhidos por filtração e lavados diversas vezes com água destilada. Enquanto os nanocompósitos com CV foram secos durante toda a noite num exsiccador com sílica gel os nanocompósitos com CB foram liofilizados.

### **7.3 Culturas e meios de cultura para os ensaios antibacterianos**

As estirpes microbianas utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo DSMZ - Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (Coleção Alemã de Micro-organismos e culturas celulares). *B. subtilis* ATCC 6633 (DSM 347), *K. pneumoniae* ATCC 4352 (DSM 789), *S. aureus* ATCC 6538 (DSM 799) e *E. coli* ATCC 10536 (DSM 682) foram mantidas congeladas ( $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ) e transferidas mensalmente para TSA (*Tryptone Soya Agar*) preparado com triptona  $15\text{ g.L}^{-1}$ ; peptona de soja  $5\text{ g.L}^{-1}$ ; NaCl  $5\text{ g.L}^{-1}$  e agar bacteriológico neutralizado  $15\text{ g.L}^{-1}$ .

## 7.4 Ensaios antimicrobianos de nanocompósitos

### 7.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana dos nanocompósitos celulose/Ag, quitosano/Ag e celulose/Cu

A atividade antibacteriana dos nanocompósitos preparados foi testada em diversas bactérias, nomeadamente *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. As bactérias foram cultivadas a 37 °C durante toda a noite em 20 mL de um meio de cultura composto por 1 g.L<sup>-1</sup> de extrato de carne, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona neutralizada, 2 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5g.L<sup>-1</sup> NaCl (agitação horizontal a 100 rpm) com exceção da *B. subtilis* que foi cultivada a 30 °C.

O método usado para a avaliação da atividade antibacteriana foi baseado numa metodologia padrão (*dynamic shake flask method*) [10], normalmente usado em têxteis para avaliar os aditivos antimicrobianos contidos nas fibras. As amostras a testar foram colocadas na suspensão líquida das bactérias e colocadas sob agitação vigorosa durante todo o ensaio de modo a garantir um bom contacto entre as fibras e as bactérias. Para os tempos 0 e 24 h, a concentração bacteriana (CFU.mL<sup>-1</sup>) da suspensão microbiana foi determinada através da diluição em série das suspensões em placas de agar de modo a obter o número total de bactérias (CFU).

As condições de teste foram as seguintes:

- *Suspensão líquida microbiana*: 10 mL (nanocompósitos celulose/Ag) ou 5 mL (nanocompósitos CH/Ag) de tampão fosfato (0,3 mM, pH 7,2) inoculado com as bactérias (10<sup>-4</sup> a 10<sup>-5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>).

- *Volume total do frasco*: 100 mL (nanocompósitos celulose/Ag) e 25 mL (nanocompósitos CH/Ag).

- *Incubação das amostras*: 24 h a 23 ± 1 °C sob agitação vigorosa.

- *Quantidade de amostra testada*: 300 mg para amostras com CV, 50 mg para amostras com BC/Ag, e 10 mg para os nanocompósitos de quitosano (para a BC e quitosano, os materiais foram cortados em pequenos pedaços), derivados modificados quimicamente do quitosano e pululano.

- Todas as amostras foram esterilizadas.

- *Amostras de controlo*: As amostras dos vários substratos sem a presença de NPs foram testadas como amostras de controlo enquanto o crescimento das bactérias em placas contendo apenas o pré-inóculo das mesmas foi usado como referência interna do método.

Geralmente foram testadas dois tipos distintos de condições:

- (a) *Sem crescimento de bactérias*: ausência de nutrientes no meio de cultura (para validar o teste antibacteriano pelo menos o mesmo numero de bactérias inicialmente inoculado é esperado no fim do teste para as amostras de controlo).
- (b) *Com crescimento de bactérias*: 5% do caldo nutritivo no meio de cultura (para validar o teste pelo menos o aumento de 1 valor no log da concentração inicial de bactérias é esperado no fim do teste para as amostras de controlo).

Foram realizadas amostras de controlo em todos os ensaios antibacterianos usando todas as matrizes puras. A atividade antibacteriana de todos os nanocompósitos foi calculada através da fórmula:

$$\log \text{redução} = \log \text{CFU T24 amostra de controlo} - \log \text{CFU nanocompósito}$$

#### **7.4.2 Avaliação qualitativa da atividade antibacteriana dos nanocompósitos CH/Ag (teste de halo)**

Amostras dos filmes de CH/Ag sob a forma de pequenos discos foram colocadas em placas de agar inoculadas previamente com a *S. aureus*. Após a incubação, a presença de uma zona de inibição por baixo e à volta do disco foi verificada por controlo visual. As condições específicas adotadas neste teste foram:

- *Preparação das placas de agar*: o PDA (*potato dextrose agar*) para as placas foi fundido no micro-ondas e condicionado num banho de água a 45 °C sendo o agar posteriormente inoculado com a suspensão da *S. aureus* até uma concentração final de bactérias no meio de aproximadamente  $1 \times 10^5 \text{ CFU.mL}^{-1}$ . 20 mL de agar inoculado foram colocados em placas de Petri e deixados a solidificar.

Foram cortadas amostras sob a forma circular (15 mm de diâmetro) dos filmes de CH/Ag. Cada disco foi colocado no centro de uma placa de Petri inoculada. Estas placas foram então incubadas durante toda a noite a 37 °C. Cada nanocompósito, assim como a amostra de controlo (filme de CH), foram testados em duplicado. Foi também testada uma placa de controlo inoculada com o *S. aureus* sem a adição de nenhum filme.

Após a incubação a presença de halos de inibição à volta das amostras foi verificada e medida se presente. Para além disso, os discos dos nanocompósitos foram removidos de modo a verificar a presença ou ausência de crescimento de bactérias por baixo das amostras.



### 7.4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos nanocompósitos pululano/Ag

O fungo usado para a determinação da atividade antifúngica dos filmes de pululano/Ag foi o *A. niger*. Os filmes sob a forma de disco (3 cm de diâmetro) foram colocados no centro das placas de Petri inoculados com PDA. Antes de cada ensaio, o fungo foi cultivado aerobicamente por 48 h a 25 °C no caldo nutritivo. Em seguida, uma alíquota desta cultura (100 µL) foi transferida assepticamente para 100 mL de uma nova solução de caldo nutritivo deixando-se a crescer durante a noite a 25 °C. As suspensões do fungo foram preparadas a partir desta nova solução sendo diluída 100 vezes em solução de Ringer. Foram transferidos e posteriormente espalhados 100 µL desta suspensão líquida para as placas de PDA com os filmes (amostras de ensaio) de acordo com a norma NP 3277-1 (1987). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Outro ensaio contendo apenas o filme de pululano puro (amostra de controlo) foi efetuado também em triplicado. Após 4 dias de incubação numa estufa a 25 °C, foi contado o número de colónias e determinado o número de unidades formadoras de colónias por mililitro (CFU.mL<sup>-1</sup>). A percentagem de inibição fúngica (FGI) dos filmes ao *A. niger* foi calculada através da fórmula:

$$FGI (\%) = \frac{C_g - T_g}{C_g} \times 100$$

Onde C<sub>g</sub> é a concentração média do conjunto de amostras de controlo e T<sub>g</sub> é a concentração média do conjunto analisado (amostras de ensaio). Os valores obtidos para a concentração de cada uma das amostras correspondem à média de três experiências independentes e são representadas com barras de erro correspondentes aos respetivos desvios padrão.

### 7.4.4 Estudo da atividade antifúngica dos nanocompósitos PL/Ag como material de embalagem de frutos

Neste trabalho foram utilizados morangos como fruto de estudo e o nanocompósito PL/AgB2 como filme de revestimento a avaliar. O filme de PL foi utilizado como amostra de controlo.

Numa primeiro teste colocou-se num recipiente um morango saudável perto de outro morango em decomposição (com fungos), fazendo-se o controlo diário das amostras. Os filmes usados para o revestimento dos recipientes foram furados para poder haver circulação de ar.

Após este ensaio, colocou-se apenas um morango em boas condições em cada recipiente, testando-se neste caso o uso de um recipiente sem qualquer filme para revestir os morangos. De igual modo os filmes foram furados de modo a terem pequenos orifícios. Este ensaio foi realizado

em triplicado para todas as amostras. As amostras foram controladas diariamente de modo a verificar o tempo necessário para a observação do aparecimento de fungos.

## ***7.5 Técnicas e métodos de caracterização instrumental***

### **7.5.1 Difração de raios X de pós (XRD)**

A difração de raios X foi efetuada à temperatura ambiente usando um difractor Philips X'Pert MPD usando radiação Cu-K<sub>α</sub> ( $\lambda=1,54178 \text{ \AA}$ ) a 40kV/50mA. As amostras de nanocompósitos foram prensadas e seguidamente depositadas num substrato de Si antes de analisadas.

### **7.5.2 Dispersão dinâmica de luz (DLS)**

A análise do tamanho de partículas e medição do potencial Zeta das soluções foi realizado usando um ZetaSizer Nano ZS (green badge) modelo Zen3500 da Malvern.

### **7.5.3 Espectrometria de emissão atômica por ICP**

As análises químicas dos elementos Ag, Au e Cu foram realizadas num espectrómetro Jobin Yvon 70 Plus no Laboratório Central de Análises de Aveiro. De forma a garantir a solubilização de todos os elementos, as amostras foram digeridas com uma solução de HCl/HNO<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub> e posteriormente sujeitas a aquecimento num forno micro-ondas.

### **7.5.4 Espectrometria de RMN <sup>1</sup>H**

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H das amostras de quitosano foram registrados usando um espectrofotómetro Brüker DRX Advance 300. As amostras foram preparadas adicionando, num tubo de RMN, uma pequena quantidade de amostra (cerca de 5 mg) a 3 mL de D<sub>2</sub>O. Os espectros foram adquiridos a 300,13 MHz.

### 7.5.5 Espetroscopia de UV-Vis

Os espectros de absorção de UV-Vis das amostras líquidas foram registrados num espectrofotômetro Jasco V-560 UV/VIS (190-900 nm), usando cuvetes de quartzo e o respectivo solvente como referência. Os espectros de absorção das amostras sólidas foram adquiridos aplicando a função Kubelka/Munk aos espectros obtidos no modo de refletância difusa utilizando o mesmo equipamento e usando MgO como referência.

### 7.5.6 Espetroscopia vibracional

**FTIR** - Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados a partir de pastilhas de KBr (1 %) num espectrômetro com transformadas de *Fourier*, Mattson 7000, para uma gama de números de onda de 200 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 acumulações. Os espectros de infravermelho usando o modo de ATR foram obtidos no mesmo espectrômetro equipado com um sistema de refletância total atenuada da Specac MKII – Golden Gate, com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 256 acumulações diretamente a partir da amostra sólida.

**Raman** - Os espectros de Raman foram obtidos utilizando um espectrômetro com transformadas de *Fourier*, Brüker RFS100/S (laser Nd:YAG, excitação 1064 nm), numa gama de números de onda de 50 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução 4  $\text{cm}^{-1}$  e número de acumulações e potência de laser diversos (em função da amostra). Os espectros foram obtidos a partir de amostras sólidas.

### 7.5.7 Medição da espessura dos filmes

A espessura dos filmes compósitos com quitosano e pululano foi medida usando um micrômetro digital modelo MDE.25TJ da Mitutoyo Corp. A espessura média foi calculada através de 10 medições em cada amostra do nanocompósito em posições distintas.

### 7.5.8 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e de varrimento em transmissão (STEM) de alta resolução

A microscopia eletrônica de varrimento foi realizada usando um microscópio FEG–SEM Hitachi S4100 operando a 25 kV e um microscópio de baixa voltagem FE-SEM Hitachi SU70-47 equipado com um acessório de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) (Detetor EDX: AXS Bruker, Soft-290ware: Quantax). A preparação das amostras consistiu em colar os

filmes com cola de carbono, num substrato de alumínio. As amostras foram previamente “depositadas” com carbono (usando um evaporador de carbono).

A microscopia eletrónica de varrimento em transmissão de alta resolução foi realizada num microscópio FE-SEM Hitachi SU70-47 operando a 30 kV em modo de varrimento ou de transmissão, respetivamente. Para realizar estas análises, as amostras foram dispersas em água ou etanol, tendo-se colocado uma alíquota da amostra sobre uma grelha de cobre revestida com filme de carbono, deixando o solvente evaporar antes da análise.

#### **7.5.9 Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)**

A microscopia eletrónica de transmissão e a análise por EDX das nanopartículas foram realizadas num microscópio Hitachi H-9000 operando a 300 kV. A preparação das amostras consistiu em colocar uma alíquota da amostra sobre uma grelha de cobre revestida com filme de carbono amorfo ou mergulhar a grelha na dispersão, deixando o solvente evaporar antes da análise.

#### **7.5.10 Microscopia de força atómica (AFM)**

Foi utilizado um microscópio MultiMode Scanning Probe com um controlador NanoScope IIIA no modo de contacto (tapping mode).

## 7.6 Referências

- [1] Desbrieres J, Martinez C, Rinaudo M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour. *Int. J. Biol. Macromol.* **1996** 19, 21-28.
- [2] Rinaudo M, Milas M, Ledung P. Characterization of chitosan - Influence of ionic-strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993** 15, 281-285.
- [3] Seong HS, Whang HS, Ko SW. Synthesis of a quaternary ammonium derivative of chito-oligosaccharide as antimicrobial agent for cellulosic fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000** 76, 2009-2015.
- [4] Creighton JA, Blatchford CG, Albrecht MG. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1979** 75, 790-798.
- [5] Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **1982** 86, 3391-3395.
- [6] Pinto RJB, Marques PAAP, Barros-Timmons AM, Trindade T, Neto CP. Novel SiO<sub>2</sub>/cellulose nanocomposites obtained by in situ synthesis and via polyelectrolytes assembly. *Compos. Sci. Technol.* **2008** 68, 1088-1093.
- [7] Enustun BV, Turkevich J. Coagulation of colloidal gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1963** 85, 3317-&.
- [8] Loo BH, Lee YG, Liang EJ, Kiefer W. Surface-enhanced Raman scattering from ferrocyanide and ferricyanide ions adsorbed on silver and copper colloids. *Chem. Phys. Lett.* **1998** 297, 83-89.
- [9] Chang Y, Lye ML, Zeng HC. Large-scale synthesis of high-quality ultralong copper nanowires. *Langmuir* **2005** 21, 3746-3748.
- [10] Determination of the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions (BISFA 2002, chapter 4.4, quantitative method B; ASTM E 2149:2001).